



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA MATERNAL TROMBOFİLİNİN REAL-TİME PCR İLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. İLKER GÜNEY

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gökay BOZKURT
AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA
MATERNAL TROMBOFİLİNİN
REAL-TİME PCR İLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. İLKER GÜNEY

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gökay BOZKURT

AYDIN-2014

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca suresince bana her alanda destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yetişmemi sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Gökay Bozkurt'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Doç. Dr. Selda Demircan Sezer'e, Yard. Doç. Dr. Yusuf Ziya Aral'a Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım ve bilgi paylaşımında bulunduğum Yrd.Doç. Dr. Serkan Kurtgöz'e, Uzm. Dr. Ece Keskin'e, laboratuarda birlikte çalıştığımız Metin Çalışkan'a, Aylin Üsküplü'ye, Cansu Sevim'e ve Yeşim Canözler'e, hiçbir zaman benden desteğini eksik etmeyen ve her zaman yanımda olan ve canım annem, babam ve kardeşime, her şart ve koşulda yanımda olan varlıklarını hiçbir şeye değişmeyeceğim, sevgili eşim Eda'ya ve biricik kızım Sena'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr.İlker GÜNEY

İÇİNDEKİLER	
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO DİZİNİ	IV
ŞEKİL DİZİNİ	V
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Etiyolojik Faktörler	2
A. Endokrin Nedenler	2
a) Tip2 Diyabetes Mellitus (DM)	2
b) Hipo/Hipertiroidi	2
c) Hiperprolaktinemi	3
d) Polikistik Over Sendromu	3
B. Anatomik Nedenler	3
C. İmmünolojik Nedenler	3
a) Otoimmün Nedenler	3
b) Alloimmün Nedenler	4
D. Enfeksiyona Bağlı Nedenler	4
E. Çevresel Nedenler	4
F. Genetik Nedenler	5
a) Kromozomal Düzensizlikler	5
G. Trombofilik Nedenler	6
a) Kazanılmış Trombofilik Nedenler	7
b) Kalıtsal Trombofilik Nedenler	8
2.2 Normal Hemostaz Mekanizması ve Koagülasyon Sistemi	9
Doğal Koagülasyon İnhibitörleri ve Fibrinolitik Sistem	10
Trombofili	10
Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) ve Hiperhomosistinemi	11
Metilentetrahidrofolat Redüktaz C677T Polimorfizmi	12
Metilentetrahidrofolat Redüktaz A1298C Polimorfizmi	12

Faktör V Leiden (G1691A) Mutasyonu ve Aktive Protein C Rezistansı	13
Protrombin G20210A Mutasyonu	14
Faktör XIII V34L Mutasyonu	15
Beta-Fibrinojen -455 G/A Polimorfizmi	16
Hasta Grubu	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar	18
Polimorfizmlerin Analizi İçin Çalışma Protokolü	19
Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RealTime PCR)	20
BULGULAR	26
TARTIŞMA	44
SONUÇ	45
ÖZET	46
SUMMARY	47
KAYNAKLAR	48

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: MTHFR A1298C termal profili	Sayfa 24
Tablo 2: MTHFR (C677T), mutasyonu bulunma sıklığı	Sayfa 26
Tablo 3: MTHFR (A1298C), mutasyonu bulunma sıklığı	Sayfa 26
Tablo 4: Faktör V Leiden (G1691A)mutasyonu bulunma sıklığı	Sayfa 27
Tablo 5: Protrombin G20210A mutasyonu bulunma sıklığı	Sayfa 27
Tablo 6: Faktör XIII V34Lmutasyonu bulunma sıklığı	Sayfa 28
Tablo 7: Beta-Fibrinojen -455 G/A mutasyonu bulunma sıklığı	Sayfa 29
Tablo 8: MTHFR C677T * MTHFR A1298C Mut. birlikteliği	Sayfa 29
Tablo 9 : MTHFR C677T * Faktör V Leiden G1691A Mut. birlikteliği	Sayfa 30
Tablo 10: MTHFR C677T * Protrombin G20210A Mut. birlikteliği	Sayfa 31
Tablo 11: MTHFR677 * Faktör XIII V34L Mut. birlikteliği	Sayfa 32
Tablo 12: MTHFR C677T * Beta-Fibrinojen -455 G/A Mut. birlikteliği	Sayfa 33
Tablo 13: MTHFR A1298C * Faktör V Leiden G1691A Mut. birlikteliği	Sayfa 34
Tablo 14: MTHFR1298 * Protrombin G20210A Mut. birlikteliği	Sayfa 35
Tablo 15: MTHFR1298 * Faktör XIII V34L Mut. birlikteliği	Sayfa 36
Tablo 16: MTHFR1298 * Beta-Fibrinojen -455 G/A Mut. birlikteliği	Sayfa 37
Tablo 17: Faktör V G1691A * Protrombin G20210A Mut. birlikteliği	Sayfa 38
Tablo 18: Faktör V G1691A* Faktör XIII V34L Mut. birlikteliği	Sayfa 39
Tablo 19: Faktör V G1691A * Beta-Fibrinojen -455 G/A Mut. birlikteliği	Sayfa 40
Tablo 20: Protrombin G20210A * Faktör XIII V34L Mut. birlikteliği	Sayfa 41
Tablo 21: Protrombin G20210A* Beta-Fibrinojen -455 G/A Mut. birlikteliği	Sayfa 42
Tablo 22: Faktör XIII V34L * Beta-Fibrinojen -455 G/A Mut. birlikteliği	Sayfa 43

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Hemostaz Mekanizmaları	Sayfa 9
Şekil 2: Folik asit ve Homosistein-Metiyonin metabolizması	Sayfa 12
Şekil 3: Aktive Protein C'nin koagülasyon sistemindeki yeri	Sayfa 14
Şekil 4: Hibridizasyon problemleri	Sayfa 21
Şekil 5: Annealing basamağında eksite olan problemler	Sayfa 22
Şekil 6: MTHFR A1298C polimorfizmi. Kanal 2 (640)'de görülebilecek genotiplerin erime eğrisi sonuçları	Sayfa 25

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
RPM	Revolution per minute- Dakikadaki devir sayısı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	Çift sarmal DNA
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
MTHFR	Metilen Tetrahidrofolat Reduktaz
PAI-1	Plazminojen Aktivator İnhibitoru 1
ADU	Adnan Menderes Üniversitesi
Ca ⁺²	Kalsiyum
TF	Doku Faktörü
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GPL	IgG fosfolipid unit
MPL	IgM fosfolipid unit
AKA	Anti Kardiyolipin Antikor
SLE	Sistemik Lupus Eritematozis
APAS	Antifosfolipid Antikor Sendromu
APC	Aktive Protein C
t-PA	Doku Plazminojen Aktivatörü
DFYI	Doku Faktör Yolu İnhibitörü
AT-III	Antitrombin-III
EDTA	Etilendiamintetraasetiksit
RT- PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, RealTime PCR
LC	LightCycler
LED	Light Emitting Diode
FRET	Fluoresance Resonance Energy Transfer
SNP	Single-nucleotide polymorphism
Tm	Melting Temperature - Erime sıcaklığı

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Tekrarlayan gebelik kayıpları gebeliğin 20. haftasından önce 3 yada daha fazla klinik olarak saptanabilir gebelik kaybı olarak tanımlanmakta iken, yakın zamanda 2 ardışık gebelik kaybı olarak kabul edilmekte ve bu durum gebe kalmaya çalışan çiftlerin %0,5-3' ünü etkileyen önemli bir üreme sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır(1,2).

Genetik ve epidemiyolojik çalışmalar tekrarlayan gebelik kaybı etiyolojisinin multifaktöryel olduğunu, multipl genetik varyantlar ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile riskin ortaya çıktığını göstermektedir(3). Tekrarlayan gebelik kayıplarının %68'inde ise etken saptanamamaktadır ve hemostatik değişikliklerin uteroplasental dolaşımında yetersizliğe yol açarak, gebelik sırasında koagülasyon faktörlerindeki değişikliklerin abortusa neden olabileceği düşünülebilir. Gebeliğin başarılı gidişatı için yeterli uteroplasental dolaşım şarttır ve bu dolaşım hemostaz bozukluklarından etkilenebilir. Bu yüzden maternal trombofililer obstetrik açıdan önemli patolojilerdir (4). Gebelik sırasında gerek koagülasyon sisteminde gerekse fibrinolitik sistemde olan fizyolojik değişiklikler koagülasyona eğilimle sonuçlanarak trombofilik hastalıkların görülme sıklığını arttırmaktadır (5).

2012-2013 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'ne tekrarlayan gebelik kaybı nedeniyle başvuran olgularda maternal trombofili ile ilişkili genetik polimorfizmlerin (Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz C677T/A1298C, Faktör V Leiden G1691A, Protrombin G20210A , Faktör XIII V34L, Beta-Fibrinojen 455 G/A) rolünün araştırılması planlanmıştır. Bu çalışmanın tekrarlayan gebelik kayıplarını önleme ve tedavide katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Gebeliğin bilinmeyen ve üzerinde en çok durulan, aynı zamanda bizim çalışmamıza da konu olan erken fetal kayıplar, genetik problemlili fetus ve geç gebelik komplikasyonları geniş literatür derlemelerinin bulunduğu; fakat üzerinde net bir konsensüsün olmadığı konu başlıklarıdır. Son zamanlarda önemi basit bir pıhtılaşma bozukluğu olmaktan öteye taşınmış olan hereditör trombofilik hastalıklar grubu, bahsedilen komplikasyonların neden sonuç ilişkisi açısından en çok bilinmeyen olanlarındandır.

2. GENEL BİLGİLER

2-1 Tekrarlayan Gebelik Kaybında Etiyolojik Faktörler

Tekrarlayan gebelik kayıplarına aşağıda sıralanan etiyolojik neden sebep olabilmektedir.

- A. Endokrin Nedenler
- B. Anatomik Nedenler
- C. İmmünolojik Nedenler
- D. Enfeksiyona Bağlı Nedenler
- E. Çevresel Nedenler
- F. Genetik Nedenler
- G. Trombofilik Nedenler

A. Endokrin Nedenler

Tekrarlayan gebelik kayıpları ile maternal endokrin problemler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde bu ilişkinin çok açık kanıtlarının mevcut olmadığı görülmektedir. Kan glukoz regülasyonunun kötü olduğu diyabet ve yetersiz tedavi edilen hipotiroidizm düşüğe neden olabilir (6). Hiperprolaktinemi ile TGK arasında ilişkinin olmadığı kabul edilmektedir (7). Tekrarlayan gebelik kayıpları olan olguların %8'inde foliküler fazda LH hipersekresyonunun olduğu gösterilmiştir (8). Polikistik Over Sendromu (PCOS) sıklığı TGK olan olgularda genel popülasyona kıyasla daha yüksek oranda saptanmıştır (9).

a) Tip2 Diyabetes Mellitus (DM)

Kontrolsüz diyabet spontan abortus riskini üç kat arttırmaktadır. HbA1c (glikolize hemoglobin) düzeyinin yüksek olarak görüldüğü, kontrolsüz diyabette tekrarlayan gebelik kaybı riski artmaktadır. Kan şekeri ve HbA1c seviyeleri normal olan kontrollü diyabette ise tekrarlayan gebelik kaybı riski normal popülasyondan farklı değildir (10).

b) Hipo/Hipertiroidi

Tiroid hormonlarının az salınması sonucu ortaya çıkan hipotiroidi ve fazla salınması sonucu ortaya çıkan hipertiroidi durumlarının her ikisi de üreme fonksiyonunda bozulmaya neden olduğu için, tekrarlayan gebelik kaybı olgularında özellikle subklinik hipertiroidi tanısı için serum tiroid stimulan hormon (TSH) düzeyinin değerlendirilmesi önerilmektedir (11).

Bazı araştırmalarda antitiroid antikorlarının da gebelik kaybı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Ancak randomize çalışmaların sonuçlarına göre, antitiroid antikorlarının tekrarlayan gebelik kaybı ile ilişkisi kesin olarak gösterilememiştir ve ayrıca antitiroid

antikor pozitifliğinin günümüzde etkin tedavisi de mevcut değildir. Bu nedenle, tiroid otoantikor taramasının da tekrarlayan gebelik kaybı değerlendirmesi algoritmasında yeri yoktur (12,13).

c) Hiperprolaktinemi

Tekrarlayan gebelik kaybı olgularında, erken gebelik döneminde prolaktin düzeyinde yükseklik hiperprolaktinemi olarak bilinmektedir. Kan prolaktin seviyesinin artması korpus luteum fonksiyonunu bozmakta ve gebelik gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak gebelik döneminde hiperprolaktinemi tedavisi verilen ve verilmeyen olguları içeren randomize kontrollü çalışma sonuçlarına göre, gebelik kaybının önlenmesi açısından anlamlı fark saptanamamıştır. Bu nedenle, rutin prolaktin taramasının TGK tanısındaki etkinliği tartışmalıdır (14,15).

d) Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PCOS), nedeni kesin olarak aydınlatılamamış bir ovulasyon bozukluğudur. Hastalıkta, her menstrüel siklüste gelişerek çatlaması gereken follikül, gelişmesi yarıda kalarak over dokusu içinde 3-10 milimetre çapında bir kiste dönüşür (16). PCOS olgularının %36-56'sında tekrarlayan gebelik kaybı saptanmaktadır. PCOS olgularında gebelik kaybı; luteinize hormon (LH), testosteron, androstenedion artışı ve insülin direncine bağlanmaktadır. Bunun yanında fertil gruba göre de sadece insülin direnci (PCOS olmadan) olan olgularda da TGK sıklığı artmaktadır. Hiperinsülineminin bazı endometriyal proteinlerde (glikodelin ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-IGF) artış, uterin vasküler dirençte düşüklük yaratarak gebelik kaybına neden olduğu düşünülmektedir (17,18). PCOS'da gözlenen periferik insülin rezistansının metformin ile tedavisinin, gebelik kayıplarını azalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (19).

B. Anatomik Nedenler

Genel popülasyonda uterus anomalisi (müllerian anomali) oranı %5 dolayındadır (20). Tekrarlayan gebelik kaybı nedeniyle incelenen hastalarda yaklaşık %15 oranında uterin anatomik bozukluklara rastlanılmıştır (21). Anatomik anormallikler endometriyumun vaskülarizasyonunda defekte neden olarak anormal ve yetersiz plasantasyon sonucunda gebelik kayıplarına yol açmaktadır (22). Tekrarlayan gebelik kayıplarında uterus anatomisini etkileyen etiyolojik faktörler konjenital uterin anomaliler, fibroidler, intrauterin sineşiler (Ascherman Sendromu), myomlar, intrauterin adezyonlar

ve servikal yetersizlik yer almaktadır. Ayrıca endometriozis ve bazı endometriyal faktörler de TKG etiolojisinde suçlanmış fakat aradaki ilişki kesin olarak gösterilememiştir (23).

C. İmmünolojik Nedenler

Tekrarlayan gebelik kaybı etiolojisinde yatan immünolojik nedenler; otoimmün ve alloimmün nedenler olarak iki grupta incelenmektedir. Otoimmünitede humoral veya hücreyel yanıt, konakçının kendine özgü bir parçasına yönelir.. Alloimmün bozukluklarda fetal veya plasental antijenlere karşı anormal maternal immün yanıt oluşmaktadır (24).

a) Otoimmün Nedenler

Sistemik Lupus Eritematozis (SLE) ve Antifosfolipid Antikor Sendromu (APAS) gibi klasik otoimmün hastalıklarda gebelik kaybı riskinin artmış olduğu ileri sürülmüştür. Çeşitli araştırmalardan elde edilen veriler SLE'li kadınlarda gebelik kayıp riskinin yaklaşık %20 olduğunu belirtmektedir ve kayıplar daha çok ikinci ve üçüncü trimesterde olmaktadır (24).

Antifosfolipid antikorlar negatif yüklü fosfolipidlere bağlanan IgM ve IgG tipindeki antikorlardır. Antifosfolipid Antikorlar ile trombotik komplikasyonlar arasındaki ilişkiye APAS denir ve birçok komplikasyonu sistemik olmakla birlikte bazıları da spontan düşük, preterm doğum, erken membran rüptürü (EMR), ölü doğum, IUGR ve preeklampsi gibi gebeliğe özgü komplikasyonları olan bir sendromdur (25). Tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda yapılan geniş çalışmalarda APAS insidansının %3–5 arasında olduğu gösterilmiştir (26).

b) Alloimmün Nedenler

Anormal bağışıklık hücreleri ve sitokin üretimi ile sonuçlanan maternal immün sistem tarafından paternal antijenlerin tanınması, fetusun immünolojik rejeksiyonu, tekrarlayan gebelik kaybı nedenlerinden biri olduğu kabul edilmektedir ve bu gebelerde CD19 ve özellikle CD56 (NK) hücrelerinin yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir(27). Anne ve baba arasındaki major histokompatibilite kompleks (MHC) insan lökosit antijenlerinin (HLA) artmış benzerliği, paternal kaynaklı fetal antijenlerin anne tarafından tanınmasını engellemekte ve bazı bloke edici antikorların üretimine neden olmaktadır (28).

D. Enfeksiyona Bağlı Nedenler

Tekrarlayan gebelik kayıplarında enfeksiyonun rolü net değildir. Birinci trimester spontan gebelik kayıplarında enfeksiyonun rolünü araştıran bazı prospektif çalışmalar yayınlanmış olup, bu çalışmalarda enfeksiyonun spontan düşüklerde önemli bir rol oynamadığı gösterilmiştir (29). Bakteri, virüs ve parazitler düşüklere veya gebelik kayıplarına neden olabilir; ancak tekrarlayan düşüklere yol açmaları beklenmemektedir. Tekrarlayan gebelik kayıplarında rutin TORCH taraması önerilmemektedir (30).

E. Çevresel Nedenler

Çevresel faktörlere ilişkin bilgiler tekrarlayan gebelik kaybından çok sporadik gebelik kaybı nedenleri arasında söz edilmektedir. Alkol, sigara ve aşırı kahve tüketimi, gebelik kaybına hazırlayıcı çevresel faktörler olarak bilinmektedir. Sigara tüketiminin doza bağımlı olarak gebelik kayıp riskini günde 10 sigara içenlerde dahi arttırdığı belirtilmektedir. Etki mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte, nikotin, karbondioksit ve siyanid gibi sigara komponentlerinin, vazokonstriktif ve antimetabolik etkileriyle plasental yetersizliğe yol açtığı düşünülmektedir (31).

F. Genetik Nedenler

Tekrarlayan gebelik kaybı nedenleri arasında yer alan, genetik nedenler özellikle son yıllarda pek çok araştırmaya konu olmaktadır. Bu yoğun ilgiye rağmen, halen Tekrarlayan gebelik kaybı etiyogenezinde yer alan genetik nedenler tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Genetik nedenler arasında ilk sırayı kromozomal düzensizlikler almaktadır. Özellikle akraba evliliklerinde toplumda insidansı düşük olan resesif genetik kusurların homozigot olarak bir araya gelme olasılıkları artmaktadır. Bu durum yaşamla bağdaşmayan fetusların oluşma insidansını artırarak erken gebelik kayıplarına neden olmaktadır(32).

a) Kromozomal Düzensizlikler

Özellikle tekrarlayan birinci trimester gebelik kayıplarında en önemli neden genetik nedenler olarak tanımlanmakta ve bu nedenler içerisinde de ilk sırayı kromozom anomalileri almaktadır. Kromozom anomalileri, spontan abortus örneklerinin %50-70'inde görülmektedir (32). En yaygın anomaliler otozomal trizomiler (%60), monozomi X (%20) ve poliploidi (%40) olarak bildirilmektedir. Otozomal trizomiler, gametogenez sırasında meydana gelen mayotik ayrılmama olarak tanımlanan, de novo değişimler sonucu ortaya çıkar. Bu olguların büyük çoğunluğunda, ebeveynlerin karyotipi normal

olarak gözlenir. Abortus örneklerinde saptanan trizomilerin ise, %20-30'unu trizomi 16 oluşturmaktadır (33).

Tekrarlayan gebelik kaybı olan olguların %6-7'sinde çok maternal kaynaklı olmak üzere çiftlerden biri ya da ikisi daha, fetusta kromozomal dengesizliğe neden olabilecek kromozomal translokasyon taşıyıcısıdır, normal popülasyonda bu oran %0,2 oranında görülmektedir(34,35). Eşlerde gözlenen kromozomal farklılığa bağlı sonraki gebeliklerde dengesiz kromozom değişikliği görülme oranı, etkilenen kromozom ve değişikliğin tipine göre %1-100 arasında değişir. Sonraki gebeliklerin takibi açısından önem taşıdığından sebebi saptanamayan tüm tekrarlayan gebelik kayıplarında kromozomal mutasyonlar araştırılmalıdır. Bu nedenle, tekrarlayan gebelik kayıpları olan çiftlerde, dengeli translokasyon taşıyıcısı olup olmadıklarını belirlemek amacıyla ebeveynlerde kromozom analizlerinin yapılması gerekmektedir. Kromozom analizi ile eşlerden birinde dengeli yapısal anomali saptanması gebelik kayıplarının nedenini açıklamakta ve prenatal tanı veya PGT (Preimplantasyon Genetik Tanı) olasılığı sunması açısından önemlidir. Dişi hücrelerinde maternal veya paternal kaynaklı X kromozomlarından birinin seçici olarak inaktive olmasının da (Skewed X-kromozom inaktivasyonu) TKG olan olgularda anlamlı olarak yüksek bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (36,37).

G. Trombofilik Nedenler

Venöz tromboz oluşumunu kolaylaştıran faktörler damar zedelenmesi, venöz staz, kan akışı ve kanın bileşimindeki değişiklikler olup, uzun yıllardan beri "Virchow triadı" olarak bilinmektedir. Kan akışı ve kanın bileşimindeki değişiklikler, bugün hiperkoagülabilité ya da trombofili adını verdiğimiz doğumsal veya kazanılmış tromboz eğilimini oluşturur. Endotel zedelenmelerinde kanamanın durdurulması hemostatik mekanizmaların devreye girmesi ile mümkün olmaktadır. Vazokonstriksiyon ve platelet tıkaçı oluşumunu, koagülasyon izlemektedir.

Gebelik kayıplarında plasantasyon bozukluğu ve plesanta damar yapısında mikrotubuluslar dikkat çekici ölçüde artmış olarak tespit edilmiştir. Koagülasyon ve fibrinolitik yolların çoğu embriyonun plasantasyonu ve trofoblastların invazyonu sırasında görev yapar. Hemostatik sistem gebeliğin oluşması ve devamında önemli bir rol oynamaktadır. Trombofilik bir defekt, kişide tromboza eğilimi arttıracak bir koagülasyon sistem anomalisidir. Gebeliğin kendisi, koagülasyon ve fibrinolitik sistemlerinde

fizyolojik değişikliklerle, hiper pıhtılaşma halidir. Bunun sonucunda kazanılmış ya da kalıtsal trombofili ile etkileşim potansiyeline sahiptir. Kazanılmış veya kalıtsal olabilen trombofililer oldukça sık görülmektedir, kalıtsal trombofili taşıyıcılığının beyaz ırkta %15'ten fazla olduğu rapor edilmiştir (38).

Her iki trombofilide de fizyopatoloji benzerdir; TKG olan bazı kadınlarda gebeliğin tetiklediği trombojenik değişiklikler kişide var olan pıhtılaşmaya yatkınlığı arttırmaktadır ve böylece uteroplasental kan akımında azalma, plasental tromboz ve gebelik kaybı oluşmaktadır.

a) Kazanılmış Trombofilik Nedenler

Antifosfolipid sendromu, Behçet hastalığı, miyeloproliferatif hastalıklar, paroksizmal noktürnal hemoglobinüri, sistemik lupus eritematosus ve ülseratif kolit gibi otoimmün hastalıklar, diabetes mellitus ve Cushing gibi endokrinolojik hastalıklar, karaciğer hastalıkları, nefrotik sendrom, maligniteler ve heparine bağlı trombositopeni, kazanılmış trombofili nedenlerinden bazılarıdır(39).

Antifosfolipid Sendrom (APS)

Antifosfolipid Sendrom kendine özgü klinik ve laboratuvar özellikleri olan otoimmün bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Bu hastalarda tekrarlayan düşüklere sık rastlanmaktadır. Aynı zamanda antifosfolipid sendromlu hastaların gebeliklerinde preeklampsi ve plasental yetmezlik görölme riski normal popölasyona göre artış göstermektedir. TKG olan hastaların %10-15'inde antifosfolipid sendrom görölmektedir. Antifosfolipid antikorlar olan gebelerin %15'inde, genel popölasyonun ise %2'sinde mevcuttur. Antifosfolipid sendromun düşükle sonuçlanmasının nedeni trofoblast gelişiminin yetersizliğine bağlı fetoplasental dolaşımın bozulmasıdır(39).

Antifosfolipid sendromunun tanı kriterleri: 2006 Revize Sapporo Kriterleri
(Tanı için en az bir klinik ve bir laboratuvar kriter olmalıdır)

Klinik tanı kriterleri:

a) Vasküler tromboz:

Herhangi bir organ veya dokuda bir veya daha fazla arteriyel, venöz veya küçük damar tromboz kliniği, objektif ve geçerliliği kanıtlanmış kriterlerle (uygun görüntüleme

yöntemiyle veya histopatolojik olarak) desteklenmelidir. Histopatolojik doğrulama için, damar duvarında belirgin inflamasyon kanıtı olmaksızın tromboz olmalıdır.

b) Gebelik morbiditesi:

(i) En az bir kere, morfolojik olarak normal bir fetüsün, 10. veya daha ileri gebelik haftasında açıklanamayan ölümü. Normal fetal morfoloji USG veya muayene ile gösterilmelidir.

(ii) En az bir kere, morfolojik olarak normal bir yenidoğanın gestasyonun 34. Hf veya öncesinde preeklampsi, eklampsi veya ciddi plasental yetmezlik nedeniyle prematüre doğumu

(iii) Maternal anatomik veya hormonal anormalliklerin, ve hem maternal, hem de paternal kromozomal nedenlerin dışlanması koşuluyla, gestasyonun 10. haftası öncesinde gelişen, en az üç veya daha fazla açıklanamayan ardışık gebelik kaybı.

Laboratuvar kriterleri:

Arası en az 12 hafta olan en az iki farklı ölçümde

(i) Uygun teknikle plazmada Lupus antikoagülanı pozitifliği:

(ii) Standardize bir ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ile, serumda veya plazmada orta veya yüksek titrede IgG ve/veya IgM izotipinde (yani >40 GPL (IgG fosfolipid unit) veya MPL (IgM fosfolipid unit), veya 99 persentil üstü değerlerde) AKA (Anti Kardiyolipin Antikor) pozitifliği

(iii) Standardize bir ELISA ile, serumda veya plazmada IgG ve/veya IgM izotipinde anti-B2-glikoprotein 1 pozitifliği

b) Kalıtsal Trombofilik Nedenler

Kalıtsal trombofililer, söz konusu genlerde oluşan mutasyonları sonucu oluşan, anneden ve/veya babadan geçen kalıtsal hastalıklardır. Koagülasyon sisteminde veya damar içindeki kanın normal akışkanlığını sağlayan dengede rol alan pek çok faktörü ilgilendiren genetik mutasyonlar, sistemi tromboz lehine bozarak trombofiliye yol açabilir. En sık rastlanılan konjenital trombofili nedenleri Faktör V Leiden (G1691A), Protrombin G20210A (Faktör II), Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) gen mutasyonları ve Antitrombin III (AT III), Protein C, Protein S eksiklikleridir(40). Normal gebelikte fibrinojen, faktör II, VII, X, XII ve plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-1) seviyelerinde artış ve protein S miktarında azalma sonucu, pıhtılaşma eğilimi artmaktadır

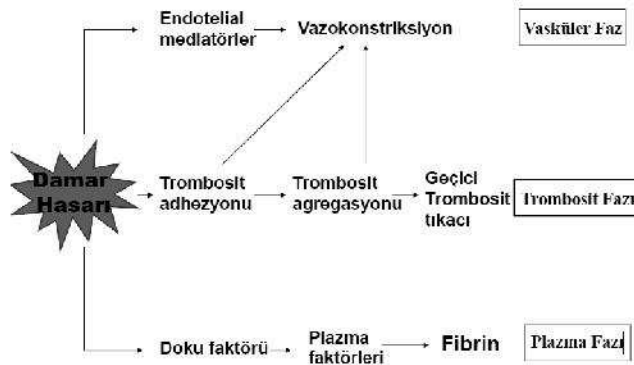
(41). Faktör V Leiden mutasyonu, Protrombin gen mutasyonu ve Protein S eksikliği ile gebelik kaybı arasında kuvvetli ilişki olduğu gösterilmiştir (42). Faktör V Leiden (G1691A) dışında Faktör V Y1702C ve Faktör V H1299R (R2) mutasyonlarının, Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1) (4G/5G) mutasyonlarının da trombofili ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkisi gösterilmiştir (45,46).

2.2 Normal Hemostaz Mekanizması ve Koagülasyon Sistemi

Hemostaz kelime anlamı olarak; hasarlanmış damarda kanı tutma, kanamayı durdurma mekanizması olarak ifade edilebilir.

Bir kanama durumunda 3 hemostatik mekanizma çalışır;

1. Kan damarlarının kasılması (vazokonstriksiyon)
2. Trombositlerin bir araya toplanıp trombosit tıkaçı oluşturması (agregasyon)
3. Kanın pıhtılaşması (koagülasyon)



Şekil 1:Hemostaz Mekanizmaları

Koagülasyon

- Koagülasyon sisteminin son ürünü plazma proteini olan fibrinojenin fibrine çevrilmesidir.
- Bu reaksiyonda trombine gereksinim duyulur.
- Fibrin kan hücreleri ile birlikte pıhtıyı oluşturur.

Fibrin pıhtının stabilizasyonu: Oluşan fibrin polimerleri kovalent disülfid bağları ile stabil kılınır. Bu aşama için FXIII (fibrin stabilize edici faktör), trombin ve Ca^{+2} gerekmektedir. FXIII'nin trombinin açığa çıkması ile aktive olur.

Doğal Koagülasyon İnhibitörleri ve Fibrinolitik Sistem

Pıhtılaşmanın sadece gerekli bölgede sınırlandırılmasında doğal koagülasyon inhibitörleri ve fibrinolitik sistem görevlidir. Koagülasyon süreci doğal koagülasyon inhibitörleri ve fibrinolitik sistemle dengelenir.

Antitrombin, protein C, protein S değişik koagülasyon faktörlerinin fizyolojik inhibitörleridir. Bir başka doğal antikoagülan endotelden salınan özgün bir inhibitör olan doku faktör yolu inhibitörüdür (DFYI). DFYI plazmada lipoproteinlere bağlı olarak dolaşır ve endotel yüzeyinde glikozaminoglikanlara bağlanır. DFYI antikoagülan etkisi iki basamaklıdır. Birinci basamakta, faktör Xa'ya bağlanarak ve Ca^{+2} bağımlı olarak Faktör Xa inhibisyonunu gerçekleştirir. İkinci basamakta DFYI Faktör X kompleksi, Faktör VIIa'yı inhibe eder. Fibrinolitik sistemde ise plazmin rol oynar. Bu süreçte fibrinolitik yanıtı t-PA (doku plazminojen aktivatörü) ile PAI-1 (Plazminojen Aktivatör İnhibitörü 1) arasındaki dinamik denge belirler.

Trombofili

Tromboz oluşumunu kolaylaştıran hemostatik bozukluklar genel olarak trombofili olarak adlandırılır. Normal hemostazın temel öğelerinden bir ya da birkaçının eksikliğinde (antitrombin, protein C, protein S gibi) ya da fazlalığında (trombositoz, pıhtılaşma faktörlerinde artma gibi), endotel bütünlüğünün bozulmasına yol açan durumlarda, kanda mevcut bir anormallikte (antifosfolipid sendromu, sepsis, inflamasyon, bazı kanserler gibi) hemostaz patolojik seyreder ve istenmeyen bir trombozla sonuçlanabilir(44).

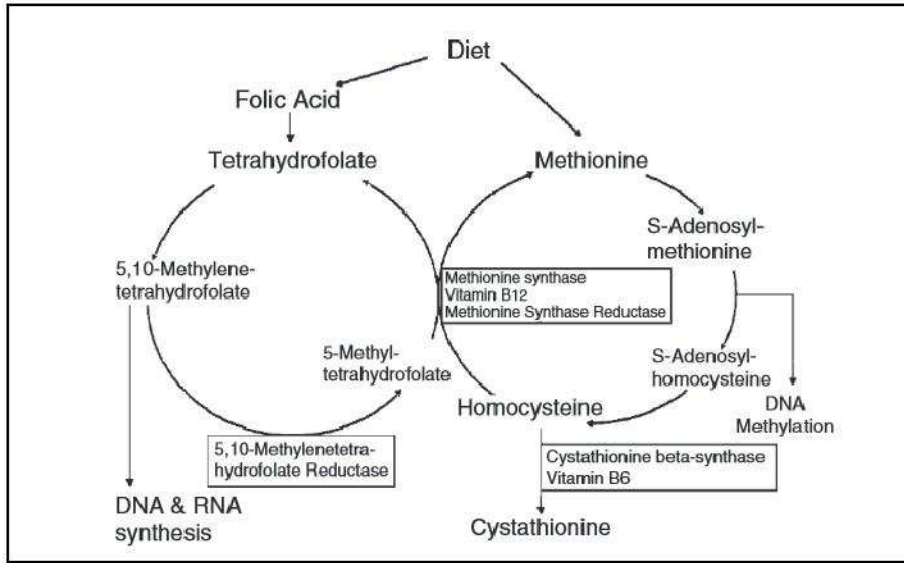
Gebelikte plazma volümü artışı en fazla 1. ve 2. trimesterde olmak üzere 24. haftada en yüksek düzeye ulaşır. Gebelikte artan plazma volümüne ek olarak hemostatik sistemde de önemli değişiklikler olmakta ve hemostatik mekanizmalar trombus oluşmasına yatkın olan yeni bir dengeye kavuşmaktadır. Bu fizyolojik değişiklikler fetoplasental dolaşımın sürdürülebilmesi açısından zorunlu olmakla beraber, kadınlarda gebelik ve puerperium sırasında tromboz açısından, gebe olmayan kadınlara göre daha riskli bir hale getirmektedir(47).

Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) ve Hiperhomosistinemi

MTHFR 1p36.23-p34.3 yer alan 2.2 kb uzunluğunda ve 11 ekzondan oluşur (48). Ekzonlar 102-432 baz uzunluğunda iken intronlar 250-1500 baz uzunluğundadır. Genin promotor bölgesi, transkripsiyon faktörlerinin bağlanabilmesi için bazı özel dizilere sahiptir, fakat TATA kutusu içermez (49).

Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında oluşan bir aminoasittir. Plazmada toplam homosisteinin %70'i proteinlere bağlanarak %25'i disülfid bağı ile birbirlerine bağlanarak ve %5'i de homosistein tiolakton halinde bulunur. Transsülfürasyon yolu sırasında katabolize olur (sistationin B sentetaz) ya da remetilasyon yolu ile metiyonine geri çevrilir (5,10 metilentetrahidrofolat redüktaz) (50). Homosistein metabolizmasında rol alan yollardaki defektler hiperhomosisteinemiye neden olur. Otozomal dominant geçişli sistationin B-redüktaz yetersizliği (genel popülasyonda sıklığı %0,3-1,4) veya MTHFR gen mutasyonu hiperhomosisteinemi nedenidir (54). Kanda homosistein düzeyinin yükselmesi nöral tüp defekti, fetal kayıp, abrupsiyo plasental ve plasental enfarkt riskini artırır (62).

Homosistein endotelde ve vasküler düz kas hücrelerinde advers etkileri modifiye ederek, endotel ile koagülasyon sistemleri arası etkileşimde rol oynar. Serbest radikaller oluşturarak hızla otooksidasyona uğrar. Artmış oksidatif stres preeklampsiye predispozisyon oluşturabilir. Doku faktörü ekspresyonundaki artış, protein C aktivitesindeki azalma, plazminojen aktivatörlerindeki düşüş koagülasyon eğiliminde artışa sebep olur (64).



Şekil 2 Folik asit ve Homosistein-Metiyonin metabolizması(61)

Metilentetrahidrofolat Redüktaz C677T Polimorfizmi

Gen üzerinde 15 farklı mutasyon bildirilmiştir. Dördüncü ekzon bölgesinde yer alan 677. baz olan sitozin yerine timin geçmesiyle oluşan mutasyon translasyon ürününde 226. sırada yer alan alanin yerine valinin geçmesiyle neticelenir(51,52). Bu değişim enzimi ısıya duyarlı bir MTHFR varyantı haline getirir ve in vitro koşullarda MTHFR enzim aktivitesini homozigotlarda %70, heterozigotlarda ise %35 oranında azaltır(53).

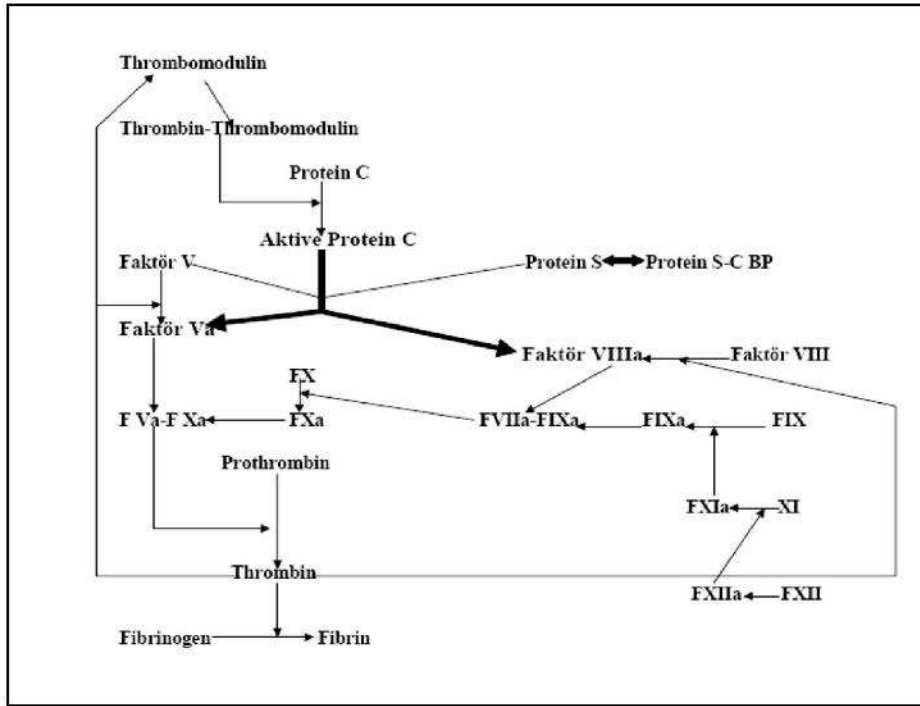
Metilentetrahidrofolat Redüktaz A1298C Polimorfizmi

MTHFR geninin 1298 no'lu nükleotidi olan adenin ile sitozinin yer değişimi sonucu, MTHFR proteininin C terminal bölgesindeki glutamat alanine dönüşür. Metilentetrahidrofolat Redüktaz enziminin aktivitesi C677T mutasyonunda olduğu gibi bu mutasyonla da azalır. Yapılan bir çalışmada plazma homosistein konsantrasyonundaki artışta MTHFR A1298C homozigot mutasyonunun C677T homozigot mutasyonu kadar etkili olmadığı düşünülmektedir. İn vitro koşullarda 1298C alleli homozigot olan bireylerde enzim aktivitesi %40 kadar azalmıştır ancak plazma homosistein düzeyleri kontrollere göre yüksek değildir(58).

Faktör V Leiden (G1691A) Mutasyonu ve Aktive Protein C Rezistansı

Faktör V Leiden mutasyonu, Faktör V molekülünde 506 pozisyonunda glutamin ile arginin aminoasit değişiminin sonucudur. Normal pıhtılaşmada aktive protein C (APC), Faktör Va ve Faktör VIII a ' yı spesifik bölgelerde ayrılma ile inaktive eder. Faktör V mutasyonunun varlığında bu faktörün ayrılması inhibe olur, böylece trombin üretimi ve pıhtı oluşumu artar. Bu mutasyon gebe olmayan bireylerde APC direncinin yaklaşık %95 inden sorumludur ve bilinen en sık tromboza genetik predispozisyonudur (65). Faktör V'in %80'i plazmada %20'si trombositlerde bulunur (66). Otozomal Dominant aktarılan mutasyon Aktive Protein C (APC)'nin Faktör V üzerindeki bağlanma yerlerinden birinde bozulmaya sebep olur. APC sağlam halinde koagülasyon faktörleri Va ve VIIla'yı kofaktör protein S varlığında inaktive eder. Mutant Faktör V APC ile inaktive olmaz, bu da artmış trombin oluşumu ve hiperkoagulatif bir ortama yol açar (67,68).

Faktör V geni 1. kromozomdadır (1q21-25). Genin 10. ekzonunun 1691 no'lu nükleotidinde guanin ile sitozin değişimi olması, molekülde aminoasit dizisini Arginin-506-Glutamin şeklinde değiştirmektedir. Bu değişime Faktör V Leiden mutasyonu denir. Faktör V Leiden mutasyonu, Faktör Va'nın aktive protein C tarafından inaktivasyonunu engellemektedir (69).



Şekil 3: Aktive Protein C'nin koagülasyon sistemindeki yeri.

Protrombin G20210A Mutasyonu

Protrombin (faktör II) koagülasyon döngüsünde faktör Xa ve Va kompleksi ile trombine çevrilmektedir. Tek bir baz çiftinin yer değiştirmesiyle meydana gelen mutasyon protrombin seviyelerini artırmaktadır, dolayısıyla tromboemboli için risk artar. En sık görülen kalıtsal trombofililerden biridir. Trombozlu hastalarda Faktör V Leiden mutasyonundan sonra en sık karşılaşılan genetik bozukluklardandır. Protrombin 11. kromozomun uzun kolunda(11p11-q12) kodlanmıştır. 14 ekzon ve 13 introndan oluşmuş 21 kilobaz büyüklüğünde bir gendir Protrombin 72 kDa ağırlığında, 569 aminoasit içeren karaciğerde K vitaminine bağımlı olarak sentezlenen bir proteindir ve trombinin öncülüdür. Protrombinin yarılanma ömrü 1.25-3.5 gündür.

Protrombin dört bölgeden oluşur;

1. Öncü dizi (271 aa),
2. Hafif zincir (49 aa),
3. Katalitik zincir (259 aa),
4. Dolaşıma katılmayan amino terminal zinciri (43 aa) (73).

Protrombinin trombine dönüşümü tüm pıhtılaşma sistemindeki en karmaşık reaksiyon dizisidir. Bu reaksiyonların gerçekleşebilmesi için FXa, FVa, Ca++ ve fosfolipide ihtiyaç vardır (74). Protrombin G20210A mutasyonu otozomal dominant kalıtım gösterir. Protrombin geninin 20210 pozisyonundaki guanin bazının adenine değişimi sonucunda gelişir (70). Bu mutasyon protrombin sentezini mRNA ve protein sentezi düzeyinde artırarak plazma protrombin miktarını çoğaltır. Protrombin G20210A mutasyonu normal kontrollere göre %30 daha fazla serum protrombin seviyelerine neden olur(71). Gebelikteki tromboembolilerin %17 sinden sorumludur. Aseptomatik Faktör V Leiden taşıyıcısında olduğu gibi tromboemboli için benzer risk taşımaktadır (72). Protrombin G20210A mutasyonunun sıklığı trombozlu hastalarda %6.2 iken sağlıklı popülasyonda %2.3'dur. Protrombindeki polimorfizme bağlı ortaya çıkan tromboz riski protrombin düzeyi ile direkt ilişkilidir. Protrombin miktarı 115 IU/dl'nin üzerinde ise tromboz riski iki kat artar (75).

Faktör XIII V34L Mutasyonu

Faktör XIII, koagülasyon kaskadının son basamağında fibrin stabilizasyonundan sorumlu bir transglutaminaz enzimidir ve fibrin stabilize edici faktör olarak da adlandırılır. Bir heterotetramer olan Faktör XIII aktif form olan A alt ünite ile inaktif formda taşıyıcı görev yapan B alt ünitesinden oluşur. Trombin aktivitesinde rol oynayan ve A alt biriminde birçok polimorfizmin tanımlanmış olduğu bir proteindir. Koagülasyon kaskadının sonuç fazında trombin ve Ca tarafından aktive edilir. Trombin, Faktör XIII-A'nın N terminal ucundan Arginin 37-Glisin 38 peptid bağını ayırır. Daha sonra Ca varlığında Faktör XIII-B subuniti ayrılır ve Faktör XIII aktif forma dönüşür. Aktif Faktör XIII fibrin monomerleri arasında kovalent bağlar oluşumunu sağlar. Faktör XIII'ün serumdaki normal değeri (%5) kadardır. %3-4 seviyeleri düşük değerler olmasına rağmen kanama komplikasyonlarını oluşturmaz. İn vitro ve in vivo çalışmalar B alt grubu sentezinin çoğunlukla hepatositte, A alt-grubunun ise kemik iliğindeki trombosit ve monosit prekürsör hücrelerinden sentezlendiği bildirilmiştir(76).

Faktör XIII Valin34Losin (FXIII V34L) mutasyonu faktör XIII geninin 34. pozisyonunda valin yerine lösinin geçmesiyle ortaya çıkar ve trombinin kesme bölgesinden 3 aminoasit uzaktaki bölgede değişime yol açar. V34L polimorfizmi artmış Faktör XIII aktivitesine neden olur. Faktör XIII V34L polimorfizminin östrojenin protrombik etkilerini ve dolayısı

ile postmenapozal dönemdeki arteriyel trombotik olayların replasman terapisinde hastaya avantaj sağladığı gösterilmiştir (77). Fibrinojen konsantrasyonları normalden düşük ile kadınlarda TKG gelişimi için bir risk faktörü olarak FXIII V34L önemine işaret eden yayınlarda mevcut(98).

Beta-Fibrinojen -455 G/A Polimorfizmi

Fibrinojen 600-700 Å uzunluğunda ve 38 Å genişliğinde, disülfid köprüleri ile bir arada tutulan, elipsoid ya da çomak şeklinde moleküllerden oluşmuş plazma proteinidir. Fibrinojen molekülü 2A α , 2 β ve 2 γ olmak üzere altı polipeptid zincirinden oluşur. Fibrinojen molekülünün uçları yüksek oranda negatif yüklüdür, bu özelliği suda çözünürlüğe katkıda bulunur ve diğer fibrinojen moleküllerinin uçlarını uzaklaştırarak agregasyonu önler. Karaciğerde sentezlenir. Plazmada fibrinojen düzeyi 200-400 mg/dl kadardır. Fibrinin onculu ve bir akut faz reaktanıdır (78). β -Fibrinojen -455GA mutasyonu, β -Fibrinojen geninin promotor bölgesinde -455. pozisyonda bulunan guanin nükleotidinin adenin nükleotidi ile yer değiştirmesi sonucu gelişir ve fonksiyonel fibrinojen molekülü sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan beta zincir transkripsiyonunda 1.2-1.5 kat artışa neden olur. Böylece yüksek plazma fibrinojen seviyesi ile ilişkilidir. Bu mutasyon sonucunda unstabil agregat bir molekül oluşur. Homozigotlarda pıhtılaşmaya yatkınlık çok daha fazladır. Bu mutasyonu taşıyanlarda venöz ve arteriyel tromboz görülme riski taşımayanlara göre artmıştır. Metz ve Bethesda 1987'de tekrarlayan düşükleri olan kadınlarda anlamlı bir şekilde plazma fibrinojen düzeylerinde artma olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu mutasyonla birlikte sigara kullanımı ve obezitenin pıhtılaşmaya yatkınlık oluşturmada arttırıcı bir rolü olduğu gösterilmiştir. Konjenital disfibrinojenemi trombozis için risk faktörüdür. Beta fibrinojen genindeki (-455G/A) bir polimorfizm yüksek plazma fibrinojen seviyeleri ile ilişkilidir (99).

β -Fibrinojen -455 AA genotipi taşıyanlarda fibrinojen düzeyleri, β -Fibrinojen -455 GG ve β -Fibrinojen - 455 GA taşıyanlara göre daha yüksektir (79), Ciacci ve Ticconi'nin yaptıkları iki ayrı çalışmada ve β -Fibrinojen -455 AA genotipi taşıyan kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybı risk artışına sebep olabileceği anlaşılmıştır. (80, 81)

Hasta Grubu

Yapılan bu çalışmada 2 Ocak 2012 - 31 Aralık 2013 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi ADU Uygulama ve Araştırma Hastanesine tekrarlayan gebelik kaybı şikayeti ile başvuran yaşları 17-45 arası, 20. gebelik haftasından önce 2 ve üzerinde düşük yapmış kromozom analizi sonucu 46,XX tespit edilen 302 kadın hastanın trombofili ile ilişkili genetik polimorfizm ve mutasyonların analiz sonuçları retrospektif olarak taranmıştır. Çalışmaya alınan hastalardan; 301 hastada MTHFR C677T, 301 hastada MTHFR A1298C, 301 hastada Faktör V G1691A, 302 hastada Protrombin G20210A, 287 hastada Faktör XIII V34L ve 287 hastada Beta-Fibrinojen -455 G/A sonuçları değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 2012-2013 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesine tekrarlayan gebelik kaybı şikayeti ile başvuran hastaların takip dosyaları retrospektif olarak taranmıştır. Dosyalarda mevcut bulunan trombofili ile ilişkili genetik polimorfizm ve mutasyonların analiz sonuçları kayıt altına alınmıştır. Mutasyon analizleri Real-Time PCR kiti (Way2Gene) kullanılarak Faktör V Leiden (G1691A), Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T / A1298C, Protrombin G20210A , Faktör XIII V34L, β -Fibrinojen -455 G/A, olmak üzere beş farklı gende 6 adet polimorfizme bakılmıştır.

Hastalardan EDTA'lı (Etilendiamintetraasetiksit) vakumlu tüplere alınan kan örneği Tıbbi Genetik Laboratuvarına gönderilmiştir.

DNA izolasyonu Roche DNA izolasyon kiti kullanılarak ile spin kolon yöntemi yapılmış ve elde edilen DNA örnekleri spektrofotometrede ölçülüp elde edilen değer kaydedilmiştir.

Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

Cihazlar

- LightCycler 1.5 Real-Time PCR cihazı
- Otomatik Mikropipet seti
- Vorteks
- Mikrosantrifuj
- Termomikser
- Spektrofotometre
- Buzdolabı
- Derin Dondurucu (-20 °C)

Marka

Roche
Eppendorf
Nuve
Nuve
Eppendorf
Thermo
Arçelik
Uğur

Kullanılan Kimyasal Maddeler

- DNA izolasyon kiti (Roche High Pure PCR Template Preparation Kit)
- MTHFR C677T Mutasyon Belirleme Kiti (Way2Gene)
- MTHFR A1298C Mutasyon Belirleme Kiti (Way2Gene)
- Faktör V Leiden (G1691A) Mutasyon Belirleme Kiti (Way2Gene)
- Protrombin G20210A Mutasyon Belirleme Kiti (Way2Gene)
- Faktör XIII V34L Mutasyon Belirleme Kiti (Way2Gene)
- β -Fibrinojen -455 G/A Mutasyon Belirleme Kiti (Way2Gene)
- Etanol (Merck Chemicals International)
- İsoopropanol (AppliChem)

DNA İzolasyonu Kiti

High Pure PCR DNA izolasyon kiti içeriği

1. Binding Buffer: 6 M Guaninidine-HCl, 10 Mm Urea, 10 Mm Tris –HCl, %20 Triton X-100 (v/v), pH 4.4 (25°C)
2. Proteinaz K (4,5 mL steril distile su ile çözüldükten sonra küçük miktarlara bölünüp -20°C’de çalışılmak üzere saklandı)
3. İnhibitor Removal Buffer: 5 M Guanidine–HCL, 20 mM Tris– HCL, pH6.6, 25°C (20 ml etanol ilave edildikten sonra kullanılmıştır)

4. Wash Buffer: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25°C (80 ml etanol ilave edildikten sonra kullanılmıştır)
5. Elution Buffer: 10 mM Tris, pH 8.5, 25°C
6. High Pure filtreli tüpler
7. Toplama (Collection) tüpleri

Polimorfizmlerin Analizi İçin Çalışma Protokolü

DNA izolasyon aşamaları

1. EDTA'lı tüp içerisine alınan kan örneğinden 200 µl steril bir eppendorf tüp içerisine alınır.
2. Üzerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K pipetlenir.
3. Karışım, pipet ile iyice karıştırıldıktan sonra daha önce 72°C'ye getirilmiş olan thermomikser cihazında 10 dakika inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyonun sonunda karışıma 100 µl isopropanol eklenir ve pipet ile iyice karıştırılır.
5. Karışım bir toplama tüpün içine yerleştirilmiş filtreli tüp içine pipetlenir.
6. 8.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Altta biriken sıvı toplama tüpü ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir.
8. Filtreli tüpün üzerine 500 µl inhibitor removal buffer pipetlenir. 8.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edilir.
9. Altta biriken sıvı toplama tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir. Filtreli tüpün üzerine 500 µl wash buffer pipetlenir.
10. 8.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edilir.
11. Altta biriken sıvı toplama tüpü ile birlikte atılır. Filtre temiz bir toplama tüp içine yerleştirilir.
12. Filtreli tüpün üzerine tekrar 500 µl wash buffer pipetlenir.
13. 8.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edilir.
14. Toplama tüpte biriken sıvı dökülür ve filtreli tüp aynı toplama tüp içine yerleştirilir.
15. 8.000 RPM'de 10 saniye santrifüj edilir.
16. Altta biriken sıvı toplama tüp ile birlikte atılır. Filtre temiz bir eppendorf tüp içerisine yerleştirilir.

17. Önceden thermomixerde 70°C’de 10dk ısıtılmış elution bufferdan 200 µl filtreli tüp içine pipetlenir.
18. 8.000 RPM’de 1 dakika santrifüj edilir.
19. Filtreli tüp atılır. İzole DNA içeren eppendorf tüp üzerine hasta adı soyadı, numarası yazılır ve DNA -20°C’de saklanır.

DNA konsantrasyonunun ölçülmesi

İzole edilen DNA’nın miktarı ve saflığı Nanodrop 2000C cihazında 2 µl DNA örneği kullanılarak ölçülmüştür. Örnekler spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyları arasında okutulmuştur. A260 nm dalga boyunda DNA konsantrasyonunu, A280 nm dalga boyunda protein konsantrasyonunu, D260/OD280 formülü ise DNA saflığını vermektedir. A260/A280 oranının 1.8 ile 2.0 arasında olması beklenir. OD’nin 2.0’nin üzerinde olması protein kontaminasyonuna, 1.8’in altında olması RNA kontaminasyonuna işaret eder. Bu durumda PCR sonuçlarının sağlıklı çıkması için DNA’nın temizlenmesi gerekir.

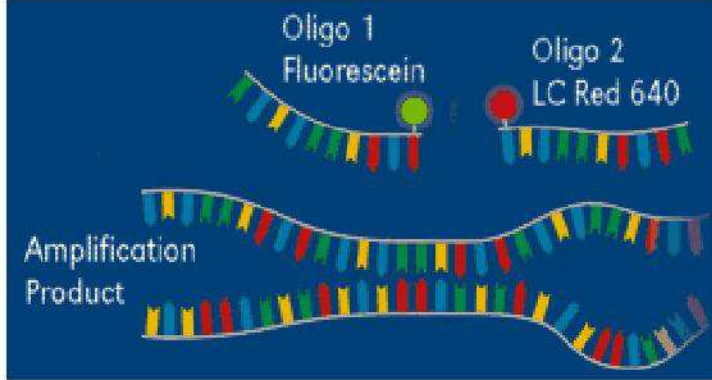
Real-time PCR kitinde (Way2Gene, TIB MOLBIOL) mutasyon analizi için istenilen optimum DNA konsantrasyonu 1-100 ng/ µl ve DNA miktarı 5-500 ng/reaksiyon değerleri arasındadır.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RealTime PCR)

LightCycler (LC) cihazı, kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, moleküler genetik çalışmalarda bir reaksiyonda polimorfik DNA bölgelerinin kantifikasyonunun ve tek nükleotid polimorfizm SNP genotiplendirilmelerinin yapılabilirdiği bir tekniktir (56). Bu teknik kullanılarak nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren flüoresans sinyalinin ölçülmesiyle kısa surede kantitatif değerler elde edilebilmektedir. Hızlı ısıtma ve soğutma özelliğine sahip olan LightCycler (LC) cihazı, 20-30 dakika içinde 30-40 PCR döngüsü gerçekleştirdiğinden çalışmalarda avantaj sağlamaktadır (56,57). Gerçek zamanlı-PCR cihazı yüksek hızı yanında, kontaminasyon riskini de minimuma indirmektedir. Ayrıca, amplifikasyon işlemi eş zamanlı olarak bilgisayarda görüntülenebildiği için PCR döngüsü başarısız olduğunda, reaksiyon çok geçmeden sonlandırılabilmekte veya döngü artışı yapılabilmektedir (55).

Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon ürünlerinin gözlenmesi en büyük kolaylığı sağlamaktadır.

LightCycler (LC) cihazı ile genotipleme çalışmalarında özgün primerlerin yanında testin özgüllüğünü arttırmak amacıyla hedefe özgü hibridizasyon problemleri kullanılmaktadır. Bu hibridizasyon problemleri, flüoresans boyalarla işaretlenen diziye özgü oligonükleotid problemlerdir. DNA zincirine baş ve kuyruk pozisyonunda hibridize olacak şekilde dizayn edilen bu problemler, DNA zincirindeki polimorfik bölgeyi örten sensor hibridizasyon probu ile bu proba yakın bir bölgeye bağlanan anchor problemlerden oluşmaktadır. Hibridizasyon problemleri amplifikasyon süresi boyunca DNA segmentine bağlıdır. Problemler hedef DNA dizisi üzerinde birbirine 1-5 nükleotid uzaklıktaki mesafede bağlanmakta ve flüoresan boya ile işaretlenmiş olan uçlar yan yana gelmektedir. LightCycler (LC) cihazının ışık kaynağından (LED: Light Emitting Diode) yayılan 470 nm'deki mavi ışık, flüoresan ile işaretlenmiş olan sensor probunu uyarak daha uzun dalga boyundaki (530 nm) yeşil flüoresan ışığın yayılmasına neden olmaktadır.

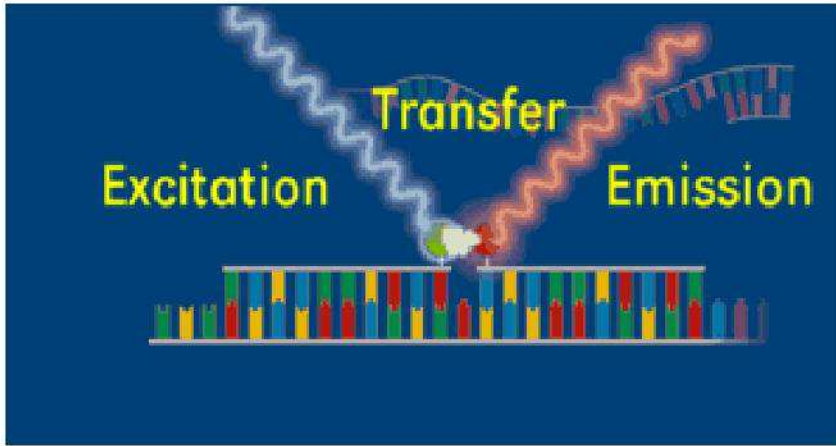


Şekil 4: Hibridizasyon problemleri

Bu hibridizasyon problemlerinden sensor prob 3' ucundan flüoresan (donör boya) ile anchor prob ise 5' ucundan LC Red 640 (alıcı boya) ile işaretlenmiştir. Denaturasyon basamağında hibridizasyon problemleri solüsyon içerisinde ayrı ayrı durmaktadırlar

İki flüoresan boya ile işaretlenmiş olan problemlerin yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek flüoresan oluşumuna yol açmakta ve yeşil ışığın enerjisi LC Red 640 boyası içinde farklı bir dalga boyundaki (640 nm) kırmızı flüoresan ışığın yayılmasına neden olmaktadır. İki prob arasında meydana gelen bu enerji

transferi “Fluoresance Resonance Energy Transfer (FRET) olarak adlandırılmaktadır. Bu enerji transferi sonucunda oluşan fluoresan miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifadeyle PCR siklusu süresince oluşan ampikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır(55). LightCycler(LC) cihazının optikle ilgili birimi olan F2 kanalı, 640 nm’deki kırmızı ışığın yoğunluğunu ölçmektedir. Ölçüm, ısımanın maksimum olduğu annealing fazı sonunda yapılabilmektedir.



Şekil 5: Annealing basamağında eksite olan probler

Annealing basamağında, probler hedef DNA dizisine yan yana bağlanır. Birinci boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı eksite eder. Eksite olan ikinci boya da emisyon enerjisi yayar.

Annealing fazından sonra, sıcaklık artar ve hibridizasyon problemleri başlayan uzama (elongation) aşaması sırasında amplikondan ayrılırlar. Elongation aşamasından sonra oluşan ampikonlar çift iplikli olduklarından hibridizasyon problemleri ile hibridize olamazlar. Bu durumda, iki prob birbirlerinden uzakta ve serbest halde oldukları için FRET gerçekleşemez.

LightCycler sistemi için kullanılan fluoresan boyalar ve ölçüm yapılan kanallar

LightCycler (LC) cihazının optik ünitesi, 3 farklı kanal ile aynı zamanda fluoresans ölçümü yapabilmektedir. 530 nm’de Kanal 1 (F1) Sybr Green I ve fluoresan

boyalarını kullanarak, 640 nm’de LC Red 640 boyasını kullanarak Kanal 2’de (F2), 705 nm’de LC Red 705 boyası kullanarak Kanal 3’de (F3) sinyalleri ölçer

Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi

Amplifikasyon metodunun online olarak görüntülenmesine ek olarak özgü amplifikasyondan sonra erime eğrisi analizi aşamasında diziye hibridizasyon problemlerinin tek iplikli DNA’ya hibridizasyonu ile mutasyonların, SNP’lerin belirlenmesini ve online olarak görüntülenmesi gerçekleşmektedir. Her çift sarmal DNA (dsDNA), kendine özgü %50’sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan erime sıcaklığı (melting temperature= T_m) değerine sahiptir. Bu erime sıcaklıkları öncelikle çift sarmal DNA’nın uzunluğuna (Zincirin uzunluğu arttıkça T_m sıcaklığı artar), GC içeriğinin derecesine (GC’den zengin fragmentlerde T_m sıcaklığı yüksektir), zincirler arasındaki bütünlüğün derecesine (zincirlerden bir tanesinin farklı bir baz içermesi T_m sıcaklığını düşürür) bağlı olarak belirlenmektedir.

Bu aşamada sıcaklık yavaş yavaş 40°C’den 75°C’ye yükselir. Hibridizasyon problemlerinin DNA zincirine hibridizasyonunu sağlayan kritik sıcaklık (T_m), mutasyon veya SNP’nin var olup olmadığının belirleyicisidir (55). Herhangi bir baz değişikliğinin oluşmadığı bir durumda, hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşir. Baz değişikliğinin söz konusu olduğu durumlarda ise hibridizasyon probu DNA kalıbı ile tam olarak eşleşemez. İki eşleşme karşılaştırıldığında baz değişikliğini içermeyen DNA kalıbı, baz değişikliğini içeren DNA kalıbına göre daha yüksek erime sıcaklığı derecesine sahip olmaktadır. İki T_m derecesi arasındaki fark ile DNA zincirinde mutasyon olup olmadığı belirlenebilmektedir. Bu erime eğrisi analizi sonucunda, floresan şiddetinin düşüşüne neden olan sıcaklık derecesine göre değerlendirilerek hastanın o gen için genotiplendirilmesi yapılmaktadır. Buna göre homozigot wild type genotipler yüksek sıcaklıkta tek pik, homozigot mutant genotipler düşük sıcaklıkta tek pik, ve heterozigot genotipler ise düşük ve yüksek sıcaklıkta 2 pik oluşturmalarına göre 3 farklı genotip belirlenebilmektedir.

LightCycler Mutasyon belirleme kiti karışımı ve çalışma protokolü

Beş farklı genin polimorfizm bölgelerine özgül primerleri ve hibridizasyon probu karışımını içermektedir.

- 1.Primerler ve Probların karışımını içeren Reagent mix (Fluorescein / Sybr Green I ve LCRed640 / LC SimpleProbe ile işaretli)
- 2.Enzim karışımı (FastStart mix)
- 3.MgCl₂
- 4.H₂O
- 5.Pozitif Kontrol
- 6.Negatif Kontrol

MTHFR A1298C / C677T, Faktör V Leiden (G1691A), Protrombin G20210A, Faktör XIII V34L, PAI-1 4G-5G, β -Fibrinojen -455 G/A, mutasyon belirleme kitlerinin içinde belirtilen termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma programlarından oluşmaktadır ve LightCycler(LC) cihazının analiz programına çalışma protokolü olarak kaydedilmiştir.

Protokol şu programları içerir:

- Program 1 : Örneklerin denaturasyonu ve enzimlerin aktivasyonu
- Program 2 : Hedef DNA'nın PCR-Amplifikasyonu
- Program 3 : Genotiplerin belirlenmesi için Erime eğrisi (melting curve) analizi
- Program 4 : Soğutma (cooling)

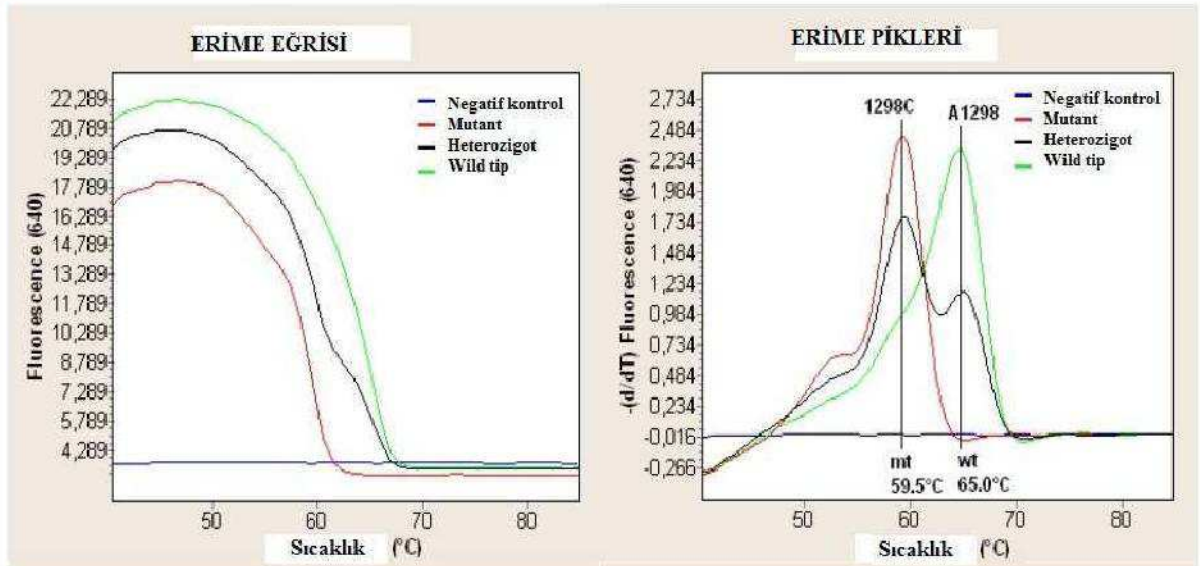
MTHFR A1298C mutasyon belirleme kiti içinde belirtilen termal profil aşağıda tablo da gösterilmiştir.

Tablo 1:MTHFR A1298C termal profili

Denaturasyon		Amplifikasyon			Melting curve					Cooling
Parametre										
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu			Erime Eğrisi modu					Yok
Dönüştür	1	45			1					1
Hedef [°C]	95	95	60	72	72	95	40	40	85	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:10	00:00:30	00:00:20	00:00:01	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.2	20	0.5	20
Acquisition Mode	Yok	yok	single	yok	yok	yok	yok	yok	step	yok

Her bir hasta örneği MTHFR A1298C polimorfizmini belirlemek için aşağıda belirtilen RT-PCR karışımı ayrı ayrı hazırlandıktan sonra, LightCycler cihazına ait özel 20 µl'lik kapiller cam tüp içerisine koyuldu. Kapiller tüpler 2500 RPM'de 10 saniye santrifüj edildi. Reaksiyon karışımının her bir kapiller tüpün dibine çöktüğü kontrol edildi. Tüpler reaksiyon tepsisine dizildikten sonra tepsi ile birlikte LightCycler cihazına yerleştirildi. Real-Time PCR işlemine başlandı ve yaklaşık bir saat sonra sonuçlar elde edildi.

MTHFR A1298C polimorfizminin belirlenmesi için yapılan çalışmada kanal 2'den flüoresan ölçümü yapıldı. MTHFR A1298C homozigot yabanıl tip (wild tip) (65°C) ve homozigot mutant genotiplerde (59.5°C) tek sıcaklık derecesinde erime piki oluşurken, heterozigot genotipde (59.5 °C ve 65°C) ise iki farklı sıcaklık derecesinde erime piki oluşmaktadır.



Şekil 7:MTHFR A1298C polimorfizmi. Kanal 2 (640)'de görülebilecek genotiplerin erime eğrisi sonuçları

RT-PCR karışımı

	Miktar (µl)
Reagent Mix	4.0
FastStart Mix	2.0
H ₂ O	7.4
MgCl ₂	1.6
Genomik DNA	5.0
Toplam	20

MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Faktör V Leiden (G1691A), Protrombin G20210A, Faktör XIII V34L, β -Fibrinojen -455 G/A, mutasyon belirleme kitlerinin içeriğinde önerilen çalışma protokollerine göre her hasta örneği için çalışma yapıldı ve analizler kaydedildi.

BULGULAR

Tablo 2: MTHFR (C677T), mutasyonu bulunma sıklığı

	Vaka	%
Homozigot	45	15,0
Heterozigot	132	43,9
Yabanıl Tip	124	41,2
Toplam	301	100,0

Tablo 3 : MTHFR (A1298C), mutasyonu bulunma sıklığı

	Vaka	%
Homozigot	45	15,0
Heterozigot	124	41,2
Yabanıl Tip	132	43,9
Toplam	301	100,0

Sazcı ve ark. yaptığı çalışmada Türk toplumunda MTHFR C677T heterozigot mutasyon sıklığı %47.4iken; yabanıl tip C677C %42,9 ve T677T homozigot mutasyon %9.6. MTHFR A1298C Türkiye'de heterozigot mutasyon sıklığı %43.7 iken; yabanıl tip A1298A %46,3; ve homozigot mutasyon C1298C %10 oranında idi(63).

Bizim çalışmamızda MTHFR C677T heterozigot mutasyon %43.9 , yabanıl tip C677C %41.2 , homozigot mutasyon T677T %15 olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda MTHFR A1298C heterozigot mutasyon %41.2 , yabanıl tip A1298A %43.9 , homozigot mutasyon C1298C %15 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4: Faktör V Leiden (G1691A)mutasyonu bulunma sıklığı

	Vaka	%
Homozigot	2	0,7
Heterozigot	36	12,0
Yabanıl Tip	263	87,4
Toplam	301	100,0

Birçok çalışmada özellikle ikinci trimester gebelik kaybının olduğu hastalarda Faktör V Leiden (G1691A) mutasyonun daha yüksek sıklıkta bulunduğu gösterilmiştir. Pek çok çalışmada FV Leiden mutasyonunun ikinci trimesterde daha yüksek bulunmasının oluşan koagülasyon problemlerinin uteroplasental dolaşımı bozmasıyla gebelik kayıplarına neden olduğunu bildirmektedir. Aytekin ve ark. yaptığı çalışmada Faktör V Leiden (G1691A) heterozigot sıklığı %13 olarak tespit edilmiştir(83).

Brenner ve ark. çalışmasında Faktör V Leiden (G1691A) heterozigot sıklığı (%32) homozigot sıklığı (%7) olarak tespit edilmiştir (84), Cardona ve ark. çalışmasında Faktör V Leiden (G1691A) heterozigot sıklığı (%1,1) homozigot sıklığı (%0) olarak tespit edilmiştir(85) Sezer ve ark. çalışmasında Faktör V Leiden (G1691A) heterozigot sıklığı (%6,5) homozigot sıklığı (%0) olarak tespit edilmiştir(86).

Bizim çalışmamızda Faktör V Leiden (G1691A) heterozigot sıklığı %12 olarak hesaplanmıştır. Faktör V Leiden (G1691A) homozigot sıklığı %0,7 olarak tespit edilmiştir

Tablo 5: Protrombin G20210A mutasyonu bulunma sıklığı

	Vaka	%
Homozigot	1	0,3
Heterozigot	19	6,3
Yabanıl Tip	282	93,4
Toplam	302	100,0

Protrombin geni promotor bölgesindeki G20210A mutasyonu protrombinin fazla aktive olmasına neden olur ve bunun sonucunda da venöz trombozlar gözlenebilir. Yapılan bir çalışmada başlangıçta venöz tromboemboli öyküsü olan bayanların %13-17'sinde bu mutasyonun olduğu ve gebelik sırasında da bu mutasyon taşıyıcılarında %0.5 oranında gerçek pıhtılaşma riski olduğu bildirilmiştir(95).

Literatürde protrombin heterozigot mutasyon prevalansı %2-3 olarak bildirilmektedir(87) Brenner ve ark. çalışmasında Faktör II G20210A heterozigot sıklığı (%8) olarak tespit edilmiştir (84), Cardona ve ark. çalışmasında Faktör II G20210A heterozigot sıklığı (%1,1) homozigot sıklığı (%0) olarak tespit edilmiştir(85), Sezer ve ark. çalışmasında Faktör II G20210A heterozigot sıklığı (%6,5) homozigot sıklığı (%0) olarak tespit edilmiştir, (86) Türkiye' de yapılan araştırmalar incelendiğinde, protrombin heterozigot gen mutasyonunun TKG grubunda %0-7, kontrol gruplarında ise %0-5 arasında değiştiği gözlenmektedir (88,94).

Bizim çalışmamızda Faktör II G20210A heterozigot sıklığı (%6,3) homozigot sıklığı (%0,3) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 6: Faktör XIII V34L mutasyonu bulunma sıklığı

	Vaka	%
Homozigot	3	1,0
Heterozigot	65	22,6
Yabanıl Tip	219	76,3
Toplam	287	100,0

Faktör XIII V34L mutasyonu prevalansı ile ilgili çok az bilgi vardır. Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre, beyaz ırkta Faktör XIII V34L heterozigot mutasyonu %32, Faktör XIII V34L homozigot mutasyonu %4, Avusturya popülasyonunda ise Faktör XIII V34L heterozigot mutasyonu %26.2, Faktör XIII V34L homozigot mutasyonu %7.8'dir(97). Elmaghoub ve ark. çalışmasında Faktör XIII V34L homozigot sıklığı (%8,5) olarak tespit edilmiştir(96).

Bizim çalışmamızda Faktör XIII V34L heterozigot sıklığı %22,6 homozigot sıklığı %1 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 7:Beta-Fibrinojen -455 G/A mutasyonu bulunma sıklığı

	Vaka	%
Homozigot	7	2,4
Heterozigot	102	35,5
Yabanıl Tip	178	62,0
Toplam	287	100,0

Yenicesu ve ark. çalışmasında Beta-Fibrinojen -455 G/A mutasyon sıklığı (%22,4) olarak tespit edilmiştir(89). Jeddi-Tehrani ark. çalışmasında Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot sıklığı %11 homozigot sıklığı %1 olarak tespit edilmiştir(100). Torabi ark. çalışmasında Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot sıklığı %33 homozigot sıklığı %3 olarak tespit edilmiştir(101).

Bizim çalışmamızda Faktör XIII V34L heterozigot sıklığı %33,8 homozigot sıklığı %2,3 olarak tespit edilmiştir

Tablo 8 :MTHFR C677T * MTHFR A1298C Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			MTHFR A1298C			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
MTHFR C677T	Homozigot	Vaka	0	1	44	45
		MTHFR677	%0	%2,2	%97,8	%100
		MTHFR 1298	%0	%0,8	%33,3	%15,0
	Heterozigot	Vaka	0	74	58	132
		MTHFR677	%0	%56,1	%43,9	%100
		MTHFR 1298	%0	%59,7	%43,9	%43,9
	Yabanıl Tip	Vaka	45	49	30	124
		MTHFR677	%36,3	%39,5	%24,2	%100
		MTHFR 1298	%100	%39,5	%22,7	%41,2
Toplam		Vaka	45	124	132	301
		MTHFR677	%15,0	%41,2	43,9%	%100
		MTHFR 1298	%100	%100	%100	%100

MTHFR C677T ve A1298C mutasyonlarının kombine olarak birlikte bulunması MTHFR aktivitesinin %40-50 oranında azalmasına buna bağlı olarak da

hiperhomosisteinemi gelişimine ve plazma folat düzeylerinin azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir(59,60).

C677T / A1298C bileşik heterozigosite sıklığı Kanada % 15, Amerika Birleşik Devletleri % 17 ve Hollanda % 20 değerleri ile kıyaslandığında, Türkiye % 21.6 bileşik heterozigosite yüksek olduğu izlenirken (82), bizim çalışmamızda A1298C homozigot/ C677T homozigot ve A1298C heterozigot / C677T homozigot hiç hasta bulunmamakta, A1298C homozigot/ C677T heterozigot 1 vaka bulunmaktadır ve sıklık % 0,3 olarak hesaplanmıştır.

C677T / A1298C bileşik heterozigosite sıklığı % 24.5 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 9 :MTHFR C677T * Faktör V Leiden G1691A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Faktör V Leiden G1691A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
MTHFR C677T	Homozigot	Vaka	0	4	41	45
		MTHFR677	%0	%8,9	%91,1	%100
		Faktör V	%0	%11,1	%15,6	%15,0
	Heterozigot	Vaka	2	14	116	132
		MTHFR677	%1,5	%10,6	%87,9	%100
		Faktör V	%100	%38,9	%44,1	%43,9
	Yabanıl Tip	Vaka	0	18	106	124
		MTHFR677	%0	%14,5	%85,5	%100
		Faktör V	%0	%50,0	%40,3	%41,2
Toplam		Vaka	2	36	263	301
		MTHFR677	%0,7	%12,0	%87,4	%100
		Faktör V	%100	%100	%100	%100

Mandel ve arkadaşlarının çalışmasında homosistein düzeylerinde hafif ve orta düzeydeki artışların Faktör V Leiden mutasyonu ile birlikteliğinin tromboza yatkınlığı arttırdığı rapor edilmiştir(102).

Bizim çalışmamızda Faktör V Leiden G1691A homozigot/ MTHFR C677T homozigot hiç hasta bulunmamakta, Faktör V Leiden G1691A homozigot/ MTHFR

C677T heterozigot 2 vaka bulunmakta sıklık % 0,66, Faktör V Leiden G1691A heterozigot / MTHFR C677T homozigot 4 vaka bulunmakta sıklık % 1,32 Faktör V Leiden G1691A heterozigot / MTHFR C677T heterozigot 14 vaka bulunmaktadır sıklık % 4,65 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 10 :MTHFR C677T * Protrombin G20210A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Protrombin G20210A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
MTHFR C677T	Homozigot	Vaka	1	4	40	45
		MTHFR677	%2,2	%8,9	%88,9	%100
		Protrombin	%100	%21,1	%14,2	%15
	Heterozigot	Vaka	0	8	124	132
		MTHFR677	%0	%6,1	%93,9	%100
		Protrombin	%0	%42,1	%44,1	%43,9
	Yabanıl Tip	Vaka	0	7	117	124
		MTHFR677	%0	%5,6	%94,4	%100
		Protrombin	%0	%36,8	%41,6	%41,2
Toplam		Vaka	1	19	281	301
		MTHFR677	%0,3	%6,3	%93,4	%100
		Protrombin	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Protrombin G20210A homozigot/ MTHFR C677T homozigot 1 vaka bulunmakta sıklık % 0,33. Protrombin G20210A homozigot/ MTHFR C677T heterozigot vaka bulunmamakta, Protrombin G20210A heterozigot / MTHFR C677T homozigot 4 vaka bulunmakta sıklık % 1,32 Protrombin G20210A heterozigot / MTHFR C677T heterozigot 8 vaka bulunmaktadır sıklık % 2,6 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 11:MTHFR677 * Faktör XIII V34L Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Faktör XIII V34L			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
MTHFR C677T	Homozigot	Vaka	0	9	34	43
		MTHFR677	%0	%20,9	%79,1	%100
		Faktör XIII	%0	%13,8	%15,6	%15,0
	Heterozigot	Vaka	2	29	91	122
		MTHFR677	%1,6	%23,8	%74,6	%100
		Faktör XIII	%66,7	%44,6	%41,7	%42,7
	Yabanıl Tip	Vaka	1	27	93	121
		MTHFR677	0,8%	%22,3	%76,9	%100
		Faktör XIII	%33,3	%41,5	%42,7	%42,3
Toplam		Vaka	3	65	218	286
		MTHFR677	%1,0	%22,7	%76,2	%100
		Faktör XIII	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Faktör XIII V34L homozigot/ MTHFR C677T homozigot vaka bulunmamakta. Faktör XIII V34L homozigot/ MTHFR C677T heterozigot 2 vaka bulunmakta sıklık % 0,66, Faktör XIII V34L heterozigot / MTHFR C677T homozigot 2 vaka bulunmakta sıklık % 0,66 . Faktör XIII V34L heterozigot / MTHFR C677T heterozigot 29 vaka bulunmaktadır sıklık % 10 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 12:MTHFR C677T * Beta-Fibrinojen -455 G/A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Beta-Fibrinojen -455 G/A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabani Tip	
MTHFR C677T	Homozigot	Vaka	2	14	27	43
		MTHFR677	%4,7	%32,6	%62,8	%100
		Fibrinojen	%28,6	%13,9	15,2%	%15,0
	Heterozigot	Vaka	2	43	77	122
		MTHFR677	%1,6	%35,2	%63,1	%100
		Fibrinojen	%28,6	%42,6	%43,3	%42,7
	Yabani Tip	Vaka	3	44	74	121
		MTHFR677	%2,5	%36,4	%61,2	%100
		Fibrinojen	%42,9	%43,6	%41,6	%42,3
Toplam		Vaka	7	101	178	286
		MTHFR677	%2,4	%35,3	%62,2	%100
		Fibrinojen	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ MTHFR C677T homozigot 2 vaka bulunmakta sıklık % 0,66. Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ MTHFR C677T heterozigot 2 vaka bulunmakta sıklık % 0,66 Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / MTHFR C677T homozigot 14 vaka bulunmakta sıklık % 4,9 . Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / MTHFR C677T heterozigot 43 vaka bulunmaktadır sıklık % 15 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 13: MTHFR A1298C * Faktör V Leiden G1691A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Faktör V Leiden G1691A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
MTHFR A1298C	Homozigot	Vaka	0	5	40	45
		MTHFR1298	%0	%11,1	%88,9	%100
		Faktör V	%0	%13,9	%15,2	%15,0
	Heterozigot	Vaka	2	12	110	124
		MTHFR1298	%1,6	%9,7	%88,7	%100
		Faktör V	%100	%33,3	%41,8	%41,2
	Yabanıl Tip	Vaka	0	19	113	132
		MTHFR1298	%0	%14,4	%85,6	%100
		Faktör V	%0	%52,8	%43,0	%43,9
Toplam		Vaka	2	36	263	301
		MTHFR1298	%0,7	%12,0	%87,4	%100
		Faktör V	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Faktör V Leiden G1691A homozigot/ MTHFR A1298C homozigot vaka bulunmamakta. Faktör V Leiden G1691A homozigot/ MTHFR A1298C heterozigot 2 vaka bulunmakta sıklık % 0,66, Faktör V Leiden G1691A heterozigot / MTHFR A1298C homozigot 5 vaka bulunmakta sıklık % 1,6 . Faktör V Leiden G1691A heterozigot / MTHFR A1298C heterozigot 12 vaka bulunmaktadır sıklık % 3,9 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 14:MTHFR1298 * Protrombin G20210A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Protrombin G20210A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
MTHFR A1298C	Homozigot	Vaka	0	3	42	45
		MTHFR1298	%0	%6,7	%93,3	%100
		Protrombin	%0	%15,8	%14,9	%15,0
	Heterozigot	Vaka	0	7	117	124
		MTHFR1298	%0	%5,6	%94,4	%100
		Protrombin	%0	%36,8	%41,6	%41,2
	Yabanıl Tip	Vaka	1	9	122	132
		MTHFR1298	%0,8	%6,8	%92,4	%100
		Protrombin	%100	%47,4	%43,4	%43,9
Toplam		Vaka	1	19	281	301
		MTHFR1298	%0,3	%6,3	%93,4	%100
		Protrombin	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Protrombin G20210A homozigot/ MTHFR A1298C homozigot vaka bulunmamakta. Protrombin G20210A homozigot/ MTHFR A1298C heterozigot 3 vaka bulunmakta sıklık % 1, Protrombin G20210A heterozigot / MTHFR A1298C homozigot 3 vaka bulunmakta sıklık % 1 . Protrombin G20210A heterozigot / MTHFR A1298C heterozigot 7 vaka bulunmaktadır sıklık % 2,3 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 15:MTHFR1298 * Faktör XIII V34L Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Faktör XIII V34L			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	WT	
MTHFR A1298C	Homozigot	Vaka	0	13	32	45
		MTHFR1298	%0	%28,9	%71,1	%100
		Faktör XIII	%0	%20,0	%14,7	%15,7
	Heterozigot	Vaka	3	27	89	119
		MTHFR1298	%2,5	%22,7	%74,8	%100
		Faktör XIII	%100	%41,5	%40,8	%41,6
	Yabanıl Tip	Vaka	0	25	97	122
		MTHFR1298	%0	%20,5	%79,5	%100
		Faktör XIII	%0	%38,5	%44,5	%42,7
Toplam		Vaka	3	65	218	286
		MTHFR1298	%1,0	%22,7	%76,2	%100
		Faktör XIII	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Faktör XIII V34L homozigot/ MTHFR A1298C homozigot vaka bulunmamakta. Faktör XIII V34L homozigot/ MTHFR A1298C heterozigot 3 vaka bulunmakta sıklık % 1, Faktör XIII V34L heterozigot / MTHFR A1298C homozigot 13 vaka bulunmakta sıklık % 4,5 . Faktör XIII V34L heterozigot / MTHFR A1298C heterozigot 27 vaka bulunmaktadır sıklık % 9,4 olarak hesaplanmıştır

Tablo 16:MTHFR1298 * Beta-Fibrinojen -455 G/A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Beta-Fibrinojen -455 G/A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
MTHFR A1298C	Homozigot	Vaka	2	14	29	45
		MTHFR1298	%4,4	%31,1	%64,4	%100
		Fibrinojen	%28,6	%13,9	%16,3	%15,7
	Heterozigot	Vaka	2	54	63	119
		MTHFR1298	%1,7	%45,4	%52,9	%100
		Fibrinojen	%28,6	%53,5	%35,4	%41,6
	Yabanıl Tip	Vaka	3	33	86	122
		MTHFR1298	%2,5	%27,0	%70,5	%100
		Fibrinojen	%42,9	%32,7	%48,3	%42,7
Toplam		Vaka	7	101	178	286
		MTHFR1298	%2,4	%35,3	%62,2	%100
		Fibrinojen	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ MTHFR A1298C homozigot 2 vaka bulunmakta sıklık % 0,7. Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ MTHFR A1298C heterozigot 2 vaka bulunmakta sıklık % 0,7. Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / MTHFR A1298C homozigot 14 vaka bulunmakta sıklık % 4,8 . Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / MTHFR A1298C heterozigot 54 vaka bulunmaktadır sıklık % 18,8 olarak hesaplanmıştır

Tablo 17:Faktör V G1691A * Protrombin G20210A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Protrombin G20210A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
Faktör V G1691A	Homozigot	Vaka	0	0	2	2
		Faktör V	%0	%0	%100	%100
		Protrombin	%0	%0	%0,7	%0,7
	Heterozigot	Vaka	0	2	34	36
		Faktör V	%0	%5,6	%94,4	%100
		Protrombin	%0	%10,5	12,1%	12,0%
	Yabanıl Tip	Vaka	1	17	245	263
		Faktör V	%0,4	%6,5	%93,2	%100
		Protrombin	%100	%89,5	%87,2	%87,4
Toplam		Vaka	1	19	281	301
		Faktör V	%0,3	%6,3	%93,4	%100
		Protrombin	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Protrombin G20210A G/A homozigot/ Faktör V G1691A homozigot vaka bulunmamakta. Protrombin G20210A G/A homozigot/ Faktör V G1691A heterozigot vaka bulunmamakta. Protrombin G20210A G/A heterozigot / Faktör V G1691A homozigot vaka bulunmamakta. Protrombin G20210A heterozigot / Faktör V G1691A heterozigot 2 vaka bulunmaktadır sıklık % 0,66 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 18:Faktör V G1691A* Faktör XIII V34L Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Faktör XIII V34L			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
Faktör V G1691A	Homozigot	Vaka	0	1	1	2
		Faktör V	%0	%50,0	%50,0	%100
		Faktör XIII	%0	%1,5	%0,5	%0,7
	Heterozigot	Vaka	0	5	30	35
		Faktör V	%0	%14,3	%85,7	%100
		Faktör XIII	%0	%7,7	%13,8	%12,2
	Yabanıl Tip	Vaka	3	59	187	249
		Faktör V	%1,2	%23,7	%75,1	%100
		Faktör XIII	%100	%90,8	%85,8	%87,1
Toplam		Vaka	3	65	218	286
		Faktör V	%1,0	%22,7	76,2%	%100
		Faktör XIII	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Faktör XIII V34L homozigot/ Faktör V G1691A homozigot vaka bulunmamakta. Faktör XIII V34L homozigot/ Faktör V G1691A heterozigot vaka bulunmamakta. Faktör XIII V34L heterozigot / Faktör V G1691A homozigot 1 vaka bulunmakta sıklık % 0,3 . Faktör XIII V34L heterozigot / Faktör V G1691A heterozigot 5 vaka bulunmaktadır sıklık % 1,7 olarak hesaplanmıştır

Tablo 19:Faktör V G1691A * Beta-Fibrinojen -455 G/A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Beta-Fibrinojen -455 G/A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
Faktör V G1691A	Homozigot	Vaka	0	1	1	2
		Faktör V	%0	%50,0	%50,0	%100
		Fibrinojen	%0	%1,0	%0,6	%0,7
	Heterozigot	Vaka	1	9	25	35
		Faktör V	%2,9	%25,7	%71,4	%100
		Fibrinojen	%14,3	%8,9	%14,0	%12,2
	Yabanıl Tip	Vaka	6	91	152	249
		Faktör V	%2,4	%36,5	%61,0	%100
		Fibrinojen	%85,7	90,1 %	%85,4	%87,1
Toplam		Vaka	7	101	178	286
		Faktör V	%2,4	%35,3	%62,2	%100
		Fibrinojen	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ Faktör V G1691A homozigot vaka bulunmamakta. Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ Faktör V G1691A heterozigot 1 vaka bulunmakta sıklık % 0,3. Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / Faktör V G1691A homozigot 1 vaka bulunmakta sıklık % 0,3 . Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / Faktör V G1691A heterozigot 9 vaka bulunmaktadır sıklık % 3,1 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 20:Protrombin G20210A * Faktör XIII V34L Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Faktör XIII V34L			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
Protrombin G20210A	Homozigot	Vaka	0	0	1	1
		Protrombin	%0	%0	%100	%100
		Faktör XIII	%0	%0	%0,5	%0,3
	Heterozigot	Vaka	0	2	16	18
		Protrombin	%0	%11,1	%88,9	%100
		Faktör XIII	%0	%3,1	%7,3	%6,3
	Yabanıl Tip	Vaka	3	63	202	268
		Protrombin	%1,1	%23,5	%75,4	%100
		Faktör XIII	%100	%96,9	%92,2	%93,4
Toplam		Vaka	3	65	219	287
		Protrombin	%1,0	%22,6	%76,3	%100
		Faktör XIII	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Faktör XIII V34L homozigot/ Protrombin G20210A homozigot vaka bulunmamakta. Faktör XIII V34L homozigot/ Protrombin G20210A heterozigot vaka bulunmamakta. Faktör XIII V34L heterozigot Protrombin G20210A homozigot vaka bulunmamakta. Faktör XIII V34L heterozigot / Protrombin G20210A heterozigot 2 vaka bulunmaktadır sıklık % 0,69 olarak hesaplanmıştır

Tablo 21:Protrombin G20210A* Beta-Fibrinojen -455 G/A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Beta-Fibrinojen -455 G/A			Toplam
			Homozigot	Heterozigot	Yabanıl Tip	
Protrombin G20210A	Homozigot	Vaka	0	0	1	1
		Protrombin	%0	%0	%100	%100
		Fibrinojen	%0	%0	0,6%	0,3%
	Heterozigot	Vaka	1	3	14	18
		Protrombin	%5,6	%16,7	%77,8	%100
		Fibrinojen	%14,3	%2,9	%7,9	%6,3
	Yabanıl Tip	Vaka	6	99	163	268
		Protrombin	%2,2	%36,9	%60,8	%100
		Fibrinojen	%85,7	%97,1	%91,6	%93,4
Toplam		Vaka	7	102	178	287
		Protrombin	%2,4	%35,5	%62,0	%100
		Fibrinojen	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ Protrombin G20210A homozigot vaka bulunmamakta. Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ Protrombin G20210A heterozigot 1 vaka bulunmaktadır sıklık % 0,34 . Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot Protrombin G20210A homozigot vaka bulunmamakta. Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / Protrombin G20210A heterozigot 3 vaka bulunmaktadır sıklık % 1 olarak hesaplanmıştır

Tablo 22:Faktör XIII V34L * Beta-Fibrinojen -455 G/A Mutasyonlarının Birlikte Görülmesi

			Beta-Fibrinojen -455 G/A			Toplam
			homozigot	heterozigot	WT	
Faktör XIII V34L	homozigot	Vaka	0	2	1	3
		Faktör XIII	%0	%66,7	%33,3	%100
		Fibrinojen	%0	%2,0	%0,6	%1,0
	heterozigot	Vaka	1	16	48	65
		Faktör XIII	%1,5	%24,6	%73,8	%100
		Fibrinojen	%14,3	%15,7	%27,0	%22,6
	WT	Vaka	6	84	129	219
		Faktör XIII	%2,7	%38,4	%58,9	%100
		Fibrinojen	%85,7	%82,4	%72,5	%76,3
Toplam		Vaka	7	102	178	287
		Faktör XIII	%2,4	%35,5	%62,0	%100
		Fibrinojen	%100	%100	%100	%100

Bizim çalışmamızda Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ Faktör XIII V34L homozigot vaka bulunmamakta. Beta-Fibrinojen -455 G/A homozigot/ Faktör XIII V34L heterozigot 1 vaka bulunmaktadır sıklık % 0,34 . Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / Faktör XIII V34L homozigot 2 vaka bulunmaktadır sıklık % 0,68 . Beta-Fibrinojen -455 G/A heterozigot / Faktör XIII V34L heterozigot 16 vaka bulunmaktadır sıklık % 5,5 olarak hesaplanmıştır

TARTIŞMA

Gebeliğin bilinmeyen ve üzerinde en çok durulan konularından olan tekrarlayan gebelik kayıpları, reproduktif dönemin sık karşılaşılan geniş literatür derlemelerinin bulunduğu fakat üzerinde net bir konsensüsün olmadığı jinekolojik problemlerinden biridir. Tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisi ile ilgili olarak şimdiye kadar birçok mekanizma öne sürülmüş ve bu mekanizmalardan bazıları hala tam olarak açıklanamamıştır. Etiyolojisi çok farklı olmakla birlikte vakaların sadece %50'sinde saptanabilir bir neden bulunabilmektedir.

Hikayesinde en az iki erken gebelik kaybı olan, genetik problemlili fetüs hikayesi olan, geç gebelik komplikasyonlarından (perinatal komplikasyonlar) herhangi biri olan hastalarda, bu komplikasyonlardan herhangi birine neden olabilecek etiyolojik faktörlerden birinin de son zamanlarda önemi basit bir pıhtılaşma bozukluğu olmaktan öteye taşınmış olan hereditör trombofili hastalık grubu olduğu düşünülmelidir. Gebeliğin trombotik olaylara eğilim yarattığı göz önüne alındığında, bu hastalıkların neden ve sonuçlarının daha net ortaya konulmasına ihtiyaç vardır.

Temel pıhtılaşma gebelik komplikasyonlarının gelişimi genellikle gen-gen ve gen-çevre etkileşimleri içeren bir çok faktörlü bir olay olduğu dikkate alınmalıdır. Polimorfizmlerin tek başlarına değil birlikte değerlendirilmeleri faydalı görünmektedir. İki veya daha fazla gen mutasyonunun pozitif saptandığı gebeler tekrarlayan fetal kayıp ve trombozlar yönünden daha dikkatli izlenmeli; anti agregan ve antikoagülan tedavi açısından sorgulanmalıdır.

Daha büyük gruplarla yapılacak daha kapsamlı çalışmalar bu önemli hasta gurubu için klinik önem taşıyacak sonuçlar sağlayacaktır. Tekrarlayan gebelik kaybının altında yatan nedenleri ortaya çıkarmaya yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalardaki etiyopatogenezin saptanması yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve tekrarlayan gebelik kaybı oranının düşürülebilmesine olanak sağlayacaktır

Tekrarlayan erken gebelik kayıpları olan, tromboz hikayesi olan olgularda Faktör V Leiden, Protrombin ve MTHFR genlerinin mutasyon açısından incelenmesi hem tanı hem de tedavi açısından faydalı olacaktır.

TGK olan kadınlarda daha fazla trombofilik gen mutasyonunun prevalansının araştırılması daha anlamlı olacaktır. Kalıtsal trombofililer fetal kayıpla olduğu kadar arteriyel ve venöz trombozlarla da ilişkili olan heterojen bir grup genetik bozukluktur. Özgeçmiş veya soy geçmişinde tromboz öyküsü olan kadınların, gebelik öncesinde Faktör V Leiden ve Protrombin gen mutasyonları açısından taramaları gebelik komplikasyonlarının önlenmesi açısından faydalı olacaktır.

Yaptığımız çalışmada tekrarlayan gebelik kaybı olan hastalarda analizi yapılan mutasyonlar literatürdeki yayınlar ile genel olarak uyumlu sonuçlar göstermektedir. Çalışmamızda kontrol grubunun olmaması nedeniyle çalışma yapılan popülasyondaki tekrarlayan gebelik kaybı olmayan kişilerdeki mutasyon oranının bilinmemesi maternal trombofililer ile tekrarlayan gebelik kaybı arasındaki ilişkiyi sağlıklı olarak ortaya koymamızı engellemektedir.

SONUÇ

Tekrarlayan gebelik kaybı etiopatogenezinin multifaktöriyel olup trombofili ilişkili kombine gen polimorfizmlerinin risk artışına neden olabileceği düşüncesine varmaktayız. Yaptığımız çalışma popülasyonlar arası polimorfizm farklılıkları nedeniyle başka popülasyonlarda da irdelenmelidir. Özellikle multifaktöriyel hastalıklarda genler arası etkileşim nedeniyle genlerin kümülatif etkisini ortaya koymak için çevresel risk faktörleri ile birlikte değerlendirmek üzere hem kümülatif etkisini hem de risk derecesini belirleyebilmek için nöral network istatistiki yöntemi ile anlamlı istatistiki sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilir.

ÖZET

Etiyolojisinde çok farklı nedenler rol almakla birlikte, vakaların sadece %50'sinde saptanabilir bir neden bulunabilmektedir. Trombofili, tekrarlayan gebelik kaybı etiolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. Herediter trombofililer, doku ve organ sistemlerinde problem oluşturdıklarında venöz tromboemboli, serebrovasküler olay, miyokard infarktüsü, pulmoner tromboemboli, benzer şekilde plasentasyon anomalileri meydana getirmesi sonucu da tekrarlayan erken gebelik kayıpları, perinatal komplikasyonlar gibi spesifik bozukluklar meydana gelmektedir.

Bu çalışmada, tekrarlayan iki veya daha fazla tekrarlayan gebelik kaybı şikayetiyle Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine Ocak 2012 ile Aralık 2013 yılları arasında başvuran ve daha önceki analizlerinde kromozomal düzeyde bir genetik değişim saptanmamış 302 hasta incelenmiştir.

Gebelikte ortaya çıkan en sık kalıtsal trombofili nedenleri Faktör-V Leiden (FV-L), protrombin G20210A ve Metilentetrahidrofolat Redüktaz MTHFR gen mutasyonlarıdır. Multipl gen mutasyonlarının tespit edildiği olgular, tekrarlayan gebelik kayıplarında etiolojide spesifik tek gen mutasyonlarına oranla daha anlamlı ve değerlidir. Gelecekte tekrarlayan gebelik kayıp riski yüksek çiftleri değerlendirmede iki veya daha fazla trombofilik gen mutasyon kombinasyonu ortaya konulabilir.

SUMMARY

Although there are various reasons in the etiology, a determinable reason can be detected only in 50% of the cases. Thrombophilia plays an important role in multiple abortus etiology. Hereditary thrombophilias cause a problem in tissue and organ system and eventually cause venous thromboemboly, cerebrovascular accidents, myocardial infarction, pulmonary thromboembolism and accordingly placentation anomalies, some specific disorders like perinatal complications and recurrent early pregnancy losses occur.

In this study, 302 patients who were admitted to Adnan Menderes University School of Medicine Hospital with the complaint of two or more recurrent pregnancy loss between January 2012 and December 2013 were studied and who has no chromosomal abnormalities in previous analysis.

The most common causes of Pregnancy-related venous thromboembolism are factor-V Leiden (FV-L), prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene mutations.

Multiple gene mutations are more important and worthy in the etiology of recurrent pregnancy loss when compared to single gen mutations. The combination of two or more thrombophilic gene mutations might be discussed in the future to evaluate the high risk couples with recurrent pregnancy loss.

KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril.* 2009;92(5):1520-1524.
2. Traina E, Daher S, Moron AF, Sun SY, Franchim CS, Mattar R. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol.* 2011;88(1):53-57.
3. Bradley LA, Palomaki GE, Bienstock J, Varga E, Scott JA. Can Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes. Results from a targeted evidence-based review. *Genet Med.* 2012 ;14:39-50.
4. Preston FE., Rosendaal FR. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *The Lancet*, 1996 ;348: 913-916.
5. Jordaan DJ, Schoon MG, Badenhorst PN. Thrombophilia screening in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*, 2005; 60: 394-404.
6. Stephenson M and Kuttah W Evaluation and Management of Recurrent Early Pregnancy Loss. *Clin Obstet Gynecol*, 2007;50:132-145.
7. Regan L, Braude PR, Trembath PL Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ*, 1989;314:253-257.
8. Li TC, Tuckerman E, Laird S, et al Endocrinological and endometrial factors in recurrent miscarriage. *BJOG*, 2000;107:1471-1479.

9. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage-a reappraisal. *Hum Reprod*, 2000; 15:612-615.
10. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG, Jovanovic-Peterson L, Van Allen M, Aarons JH, Metzger B, Bieber FR, Knopp RH, Holmes LB, et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med*. 1988 Dec 22;319(25):1617-23.
11. Glinoe D, Riahi M, Grün JP, Kinthaert J. Risk of subclinical hypothyroidism in pregnant women with asymptomatic autoimmune thyroid disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Jul;79(1):197-204.
12. Rushworth FH, Backos M., Rai R., Chilcott IT, Baxter N, Regan L. Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. *Hum Reprod* 2000; 15:1637-9.
13. Esplin MS, Branch DW, Silver R, Stagnaro-Green A. Thyroid autoantibodies are not associated with recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:1583-6.
14. Dlugi AM. Hyperprolactinemic recurrent spontaneous pregnancy loss: A true clinical entity or a spurious finding? *Fertil Steril* 1998; 70:253-5.
15. Gurbuz B, Yalti S, Ficicioglu C, Ozden S, Yildirim G, Sayar C. Basal hormone levels in women with recurrent pregnancy loss. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17:317-21.
16. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage are appraisal. *Hum Reprod* 2000; 15: 612–615.
17. Jakubowicz DJ, Seppälä M, Jakubowicz S, Rodriguez-Armas O, Rivas-Santiago A, Koistinen H, Koistinen R, Nestler JE. Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations

and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Mar;86(3):1126-33.

18. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage are appraisal. *Hum Reprod* 2000; 15:612-5.

19. Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, et al Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appear to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril*, 2001;75:46-52.

20. Porter TF and Scott JR (2005) Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol*, 19:85-101.

21. Devi Wold AS, Pham N, Arici A. Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006;24:25-32.

22. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Obstet gyneacol* 2009; 2: 839–76.

23. Burletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1996; 2: 118–136.

24. Petri M, Allbritton J. Fetal outcome of lupus pregnancy: a retrospective case-control study of the Hopkins Lupus Cohort. *J Rheumatol* 1993; 20: 650.

25. Berek JS. Novak Jinekoloji. 13. Baskı Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 2004: 1067-1117.

26. Hill JA. Sporadic and recurrent spontaneous abortion. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1994; 17: 114–162.

27. Laird SM, Tukerman EM, Cork BA, et al A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update*, 2003;9:163-174.

28. Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW, Haines RF. Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141: 987.
29. Simpson JL, Gray RH, Queenan JT, Barbato M, Perez A, Mena P, Kambic RT. Further evidence that infection is an infrequent cause of first trimester spontaneous abortion. *Hum Reprod* 1996; 11: 2058-2560.
30. Stephenson M and Kutteh W Evaluation and Management of Recurrent Early Pregnancy Loss. *Clin Obstet Gynecol*, 2007;50:132-145.
31. Amstrong BG, McDonald AD, Sloan M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health* 1992;82:85.
32. Silver RM, Branch DW. Sporadic and recurrent pregnancy loss. In: Reece AE, Hobbins J, ed. *Clinical Obstetrics: The Fetus and the Mother*. Oxford: Blackwell Publishing; 2007:143–160.
33. Wapner RJ, Lewis D. Genetics and metabolic causes of stillbirth. *Sem Perinat*. 2002;26:70–74.
34. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Obstet gynecol* 2009; 2: 839–76.
35. Porter TF and Scott JR Evidence-based care of recurrent miscarriage. *Best Prac Res Clin Obstet Gynaecol*, 2005;19:85-101.
36. Uehara S, Hashiyada M, Sato K, et al Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 2001;76:908-914.

37. Beever CL, Stephenson MD, Penaherrera MS, et al () Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet*, 2003;72:399-407
38. Greer IA. Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. *Thromb Res* 2003; 109: 73–81.
39. Lockwood CJ, Romero R, Feinberg RF, et al The prevalence and biologic significance of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a general obstetric population. *Am J Obstet Gynecol*, 1989;161: 369-373.
40. Kujovich Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol*, 2004;191:412-424.
41. Adelberg A, Kuller J. Thrombophilias and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol Survey* 2002;57:703-709.
42. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a metaanalysis. *Lancet* 2003; 361: 901–908.
43. Nemerson Y: Tissue factor and hemostasis. *Blood* 71:1; 1988.
44. Atamer T. Hemostaz mekanizması. (www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/2007thtk)
45. Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B, Tormene D, Girelli D, Girolami A, Bernardi F: Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood* 2000; 96:1443–1448.
46. Buchholz T, Thaler CJ: Inherited thrombophilia: impact on human reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:20–32

47. Kişnişçi, Gökşin, Durukan, Üstay, Ayhan, Gürkan, Önderoğlu: Rekürren abortus. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi, 1.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara,1996,1312-1318
48. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), Mammalian, Genome, 1998;9, 652-656.
49. www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=607093
50. Ueland P, Refsum H, Stabler S et al: Toplam homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. Clin Chem, 1993; 39:1764-1779.
51. Tonetti C., Burtcher A., Bories D., Tulliez M., Zittoun J. () Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency in Four Siblings: A Clinical, Biochemical, and Molecular Study of the Family. *Am J Med Genet* 2000; 91(5), 363-367.
52. Rady P.L., Tying S. K., Hundnall S. D., et al. () Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR): The Incidence of Mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish Population. *Am J Med Genet* 1999;86(4), 380-384.
53. Tepeli E, Muslumanoğlu MH, Uludağ A, Atlı E, Uzun D, Artan S. Eskişehir ilinde idiopatik tekrarlayan gebelik kayıpları ile MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri arasındaki ilişki. *Osmangazi Tıp Dergisi* 2007;29(1):1-11
54. Ray J, Laskin C Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta*, 1999;20:519-529
55. Reuter M, Kupper Y, Schmitz A, Breuer J .P, Wend U, Hennig J. Detection of new single nucleotide polymorphisms by means of real time PCR. *Journal of Genetics*, 2005;84: 3.

56. Akbaş F, Oral E. Kalıtsal trombofili ve gebelik. *Perinatoloji Dergisi* 2002;10(1): 1-7
57. Lohmann S, Lehmann L, Tabiti K. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System, *Biochemica*, 2000;4: 23-28.
58. Emiroğulları EF, Saatci C, Unal A, Ozkul Y. Arteriyovenoz fistul trombozu gelişen ve gelişmeyen kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda metilentetrahidrofolat reduktaz polimorfizmlerinin araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2007;16(3):121-8
59. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet.* 2000 Oct ;67(4):986-90.
60. Blumenfeld Z, Benjamin B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* 1999;72:765-74.
61. Kondo A, Kamihira O, Ozawa H. Neural tube defects: prevalence, etiology and prevention. *Int J Urol* 2009; 16: 49-57.
62. Nelen WL, Blom HJ, Streevers EA et al. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta analysis. *Fertil Steril* 2000;74:1196-9.
63. Sazcı A, Ergul E, Kaya G, Kara I. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct* 2005;23(1):51-4
64. Welch G, Loscalzo J: Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*, 338:1042-1051, 1998.

65. Zöller B, Svensson P, He X et al: Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein. *Can J Clin Invest*, 94:2521-2524, 1994.
66. Sılan F, Zafer C. Faktör V Leiden mutasyonu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2004;1:33-6
67. Kalafatis M., Mann K. Factor V leiden and thrombophilia. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* 1997;17, 620-627.
68. Faioni E.M., Razzari C, Martinelli I., Mannucci P.M. Resistance to activated protein C in unselected patients with arterial and venous thrombosis. *American journal of hematology* 1997;55, 59-64.
69. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, De Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7
70. Sucak G, Haznedar R. Trombofili. *Türkiye Klinikleri Cerrahi Dergisi* 2000;5:59-64
71. Pratt RW, Adams D, Balmaceda C. Hematologic and related diseases. In: Rowland LP (Ed.). *Merritt's Neurology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005:1050-64
72. Gerhardt A. Scharf R. Beckmann M et al: Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med*, 2000;342:374-380,.
73. Esmon C.T. Anticoagulant Protein Crrhrombomodulin Pathway; Tollefsen D.M. Antitrombin Deficiency; Greenberg D.L., Devie E.W. Introduction to Hemostasis and the Vit K Dependent Coagulation Factors. In: Scriver C.R., Beaudet AL., Sly W.S., Valle D., Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B. (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. USA, The Mc Graw-Hill Companies Inc. (8th ed). 2001

74. Sandra J.F.D., Davie W. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987;**26**, 6165-6177.
75. Nazliel B. Gençlerde inme. Balkan S (Ed.). *Serebrovaskuler Hastalıklar*. 3th ed. Ankara: Guneş Kitabevi 2009;375-86
76. Takahashi N, Tsukamoto H, Umeyama H, Castaman G, Rodeghiero F, Ichinose A. Molecular mechanisms of type II factor XIII deficiency: Novel Gly562Arg mutation and C terminal truncation of the A subunit cause factor XIII deficiency as characterized in a mammalian expression system. *Blood* 1998;91:2830-8
77. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, Huber J, Hopmeier P. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. *Clin Chem*. 2003 Jul;49(7):1081-6.
78. Altınışık M. www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-04.pdf
79. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al. B-fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen level and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. *Circulation* 1996;93:440-9
80. Ciacci C, Tortora R, Scudiero O, Di Fiore R, Salvatore F, Castaldo G. Early pregnancy loss in celiac women: The role of genetic markers of thrombophilia. . *Dig Liver Dis*. 2009 Oct;41(10):717-20. doi: 10.1016/j.dld.2009.02.050. Epub 2009 Apr 22.
81. Ticconi C. · Mancinelli F. · Gravina P. · Federici G. · Piccione E. · Bernardini S. Beta-fibrinogen G-455A polymorphisms and recurrent miscarriage. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;71(3):198-201

82. Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kara I. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct.* 2005 Jan-Feb;23(1):51-4
83. Aytekin E, Ergun SG, Ergun MA, Percin FE. Evaluation of Geno Flow Thrombophilia Array Test Kit in Its Detection of Mutations in Factor V Leiden (G1691A), Prothrombin G20210A, MTHFR C677T and A1298C in Blood Samples from 113 Turkish Female Patients *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014 Aug 25
84. Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N. () Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost* 1999;82(1),
85. Cardona H, Castañeda SA, Cardona Maya W, Alvarez L, Gómez J, Gómez J, Torres J, Tobón L, Bedoya G, Cadavid AP. Lack of Association between Recurrent Pregnancy Loss and Inherited Thrombophilia in a Group of Colombian Patients. *Thrombosis.* 2012;2012:367823. doi: 10.1155/2012/367823. Epub 2012 Apr 11.
86. Selda DEMİRCAN SEZER, Mert KÜÇÜK, Ali Rıza ODABAŞI, Hasan YÜKSEL, Gökay BOZKURT, Salih COŞKUN, Emre TEPEDELEN, Aykut AYDIN. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında MTHFR (C677T, A1298C) Faktör V Leiden (G1691A) ve Protrombin (G20210A) Gen Mutasyonları Sıklığı ve İlişkisi *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst.* 2011;21(3):175-83
87. Stephenson M, Kutteh W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50(1):132- 45.
88. Onderoglu L, Baykal C, Al RA, Demirtas E, Deren O, Gurgey A. High frequency of thrombophilic disorders in women with recurrent fetal miscarriage. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2006;33(1):50-4.

89. Yenicesu GI, Cetin M, Ozdemir O, Cetin A, Ozen F, Yenicesu C, et al. A prospective case control study analyzes 12 thrombophilic gene mutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(2):126-36.
90. Aksoy M, Tek I, Karabulut H, Berker B, Soylemez F. The role of thrombophilia related to Factor V Leiden and Factor II G20210A mutations in recurrent abortions. *J Pak Med Assoc* 2005;55(3):104-8.
91. Altintas A, Pasa S, Akdeniz N, Cil T, Yurt M, Ayyildiz O, et al. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations in patients with recurrent pregnancy loss: data from the southeast of Turkey. *Ann Hematol* 2007; 86(10):727-31.
92. Şahin Fİ, Ataç B, Yılmaz Z, Zeyneloğlu HB. [Thrombophilia mutation frequencies in recurrent pregnancy losses]. *Erciyes Med J* 2009; 31(2):104-9.
93. Özdemir S, Balcı O, Göktepe H, Görkemli H, Taşçı E, Acar H. [Evaluation of the frequency of thrombophilic mutations in patients with recurrent pregnancy loss]. *Genel Tıp Dergisi* 2010;20(3):93-7.
94. Eminli İ, Kara M, Yılmaz E, Öge T, Evrûke C. [Evaluation of trombophilia in habituel abortion cases]. *Zeynep Kamil Med Bull* 2009;40(3): 105-9.
95. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V, et al. Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1324-8.
96. Elmahgoub IR, Afify RA, Abdel Aal AA, El-Sherbiny WS Prevalence of coagulation factor XIII and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms among Egyptian women suffering from unexplained primary recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol*. 2014 Jun;103:18-22. doi: 10.1016/j.jri.2014.02.007. Epub 2014 Mar 19.

97. Renner W, Koppel H, Hoffman C, Schallmoser K, Stanger O, Toplak H, et al. Prothrombin G20210A, factor V Leiden, and factor XIII Val34Leu; common mutations of blood coagulation factors and deep vein thrombosis in Austria. *Thromb Res* 2000;99:35-9
98. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Oberkanins C, Atamaniuk J. Risk for early pregnancy loss by factor XIII Val34Leu: the impact of fibrinogen concentration. *J Clin Lab Anal*. 2013 Nov;27(6):444-9. doi: 10.1002/jcla.21626
99. Behague I, Poirier O, Nicaud V, et al. Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde*. *Circulation* 1996;93(3), 440-9.
100. Jeddi-Tehrani M, Torabi R, Zarnani AH, Mohammadzadeh A, Arefi S, Zeraati H, Akhondi MM, Chamani-Tabriz L, Idali F, Emami S, Zarei S. Analysis of plasminogen activator inhibitor-1, integrin beta3, beta fibrinogen, and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in Iranian women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Aug;66(2):149-56. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00974.x. Epub 2011 Jan 18.
101. Torabi R, Zarei S, Zeraati H, Zarnani AH, Akhondi MM, Hadavi R, Shiraz ES, Jeddi-Tehrani M. Combination of thrombophilic gene polymorphisms as a cause of increased the risk of recurrent pregnancy loss. *J Reprod Infertil*. 2012 Apr;13(2):89-94.
102. Mandel H, Brenner B, Berant M, Rosenberg N, Lanir N, Jakobs C, Fowler B, Seligsohn U. Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden--effect on thrombosis. *N Engl J Med*. 1996 Mar 21;334(12):763-8.